УДК 579.243; 262.

Д.Р. Абдуліна, Л.Г. Асауленко, Л.М. Пуріш

Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, МСП Д03680, Україна,
тел.: +38 (044) 526 34 79, e-mail: adara@ukr.net

ДИНАМІКА РОСТУ ПОПУЛЯЦІЙ СУЛЬФІДОГЕННОГО МІКРОБНОГО УГРУПОВАННЯ

Визначено ростові характеристики окремих мікробних популяцій сульфідогенного угруповання, сформованого у біоплівці на сталі, до якого входять сульфатвідновлювальні бактерії та їх бактерії-супутники. Асоціативні бактерії P. aeruginosa 27 та B. subtilis 36 характеризуються високими питомими швидкостями росту (0,300 год$^{-1}$ та 0,149 год$^{-1}$, відповідно), які перевищують швидкість поділу клітин сульфатвідновлювальних бактерій Desulfovibrio sp. 10 у 7–14 разів. Висловлено припущення, що різниця у швидкостях росту може слугувати однією з умов для сукцесії при формуванні корозійно-агресивного мікробного угруповання.

Ключові слова: сульфідогенне мікробне угруповання, сульфатвідновлювальні бактерії, асоціативні бактерії, параметри росту.

Взаємодія ґрунтових мікроорганізмів з підземними металевими конструкціями є складним біоелектрохімічним процесом, який у більшості випадків призводить до пошкоджень [1]. Дослідження реакції ґрунтових мікроорганізмів на зміни, особливо антропогенного та техногенного походження, у навколишньому середовищі є надзвичайно важливими для пізнання закономірностей формування корозійно-агресивних мікробних угруповань.

Бактерії корозійно-агресивного сульфідогенного угруповання можуть бути використані як модельні мікроорганізми для дослідження корозійних процесів на сталі, вивчення механізмів взаємодії бактерій з металом. Актуальним є аналіз основних факторів, що впливають на кінетику росту окремих компонентів угруповань такого типу.

Відомо, що мікробне угруповання як цілісна система повинне задовольняти вимогам термодинаміки та за даних умов існування забезпечувати необхідною енергією всі свої компоненти. Організація угруповання спрямована на максимально повне використання наявних субстратів, що забезпечується спеціалізацією організмів за субстратами живлення та метаболітами [4, 11]. Як показали наші дослідження, склад сульфідогенного

© Д.Р. Абдуліна, Л.Г. Асауленко, Л.М. Пуріш, 2011

корозійного мікробного угруповання, сформованого у біоплівці на сталі, здебільшого є сталим, домінуючими компонентами якого є сульфатвідновлювальні, залізовідновлювальні, денітрифікувальні та амоніфікувальні бактерії [12]. Кожна складова угруповання має певні кінетичні характеристики, які відіграють важливу роль у заселенні поверхонь металевих конструкцій і у подальшому формуванні біоплівки.

Проте, даних щодо порівняльної характеристики динаміки росту мікробних популяцій сульфідогенних мікробних угруповань недостатньо.

Метою наших досліджень було вивчення популяційної динаміки та кінетичних параметрів росту складових сульфідогенного мікробного угруповання: сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio* та їх супутників — бактерій родів *Pseudomonas* та *Bacillus*.

Матеріали та методи

Об'єктами дослідження були штами бактерій, виділені з сульфідогенного мікробного угруповання, сформованого у біоплівці на сталі: *Desulfovibrio sp*. 10, *Pseudomonas aeruginosa* 27 та *Bacillus subtilis* 36.

Для визначення кінетичних параметрів росту кожен з досліджуваних штамів культивували на відповідних середовищах. Для інокуляції поживних середовищ використовували культури у логарифмічній фазі росту. Сульфатвідновлювальні бактерії культивували у 50 мл флаконах протягом 14 діб за температури 28 °С на середовищі Постгейта «В» [2]. Середовище інокулювали культурою *Desulfovibrio sp*. 10 (10% від об'єму), щільно закривали гумовими пробками та культивували у стаціонарному режимі. Через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 14 діб відбирали культуральну рідину та визначали показники: титр життєздатних клітин методом граничних розведень [2, 6]; накопичення сірководню методом йодометричного титрування [5]; накопичення білка в клітинах методом Лоурі [12].

Асоціативні бактерії культивували на м'ясо-пептонному бульйоні у 500 мл флаконах за температури 28 °С. У 50 мл середовища вносили 5% об. інокуляту та культивували протягом 24 годин. Через 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24 годин культуральну рідину відбирали і визначали суху біомасу клітин гравіметрично [6] та накопичення білка клітинами.

За визначеними показниками будували логарифмічні криві росту та визначали параметри росту [14]: константу швидкості поділу (v), питому швидкість росту культур (μ), час генерації (g), час подвоєння клітин (Td). Отримані дані опрацьовували статистично за допомогою пакету програм Exel.

Результати досліджень та їх обговорення

З біоплівки, сформованої на металі сульфідогенним мікробним угрупованням, нами були виділені та ідентифіковані бактерії різних фізіологічних груп, що мають певні індивідуальні ростові характеристики

і вносять свій внесок у розвиток усього угруповання [12]. До сульфідогенного мікробного угруповання входили штами сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio* sp. 10 та їх супутників — *P. aeruginosa* 27 та *B. subtilis* 36 [3].

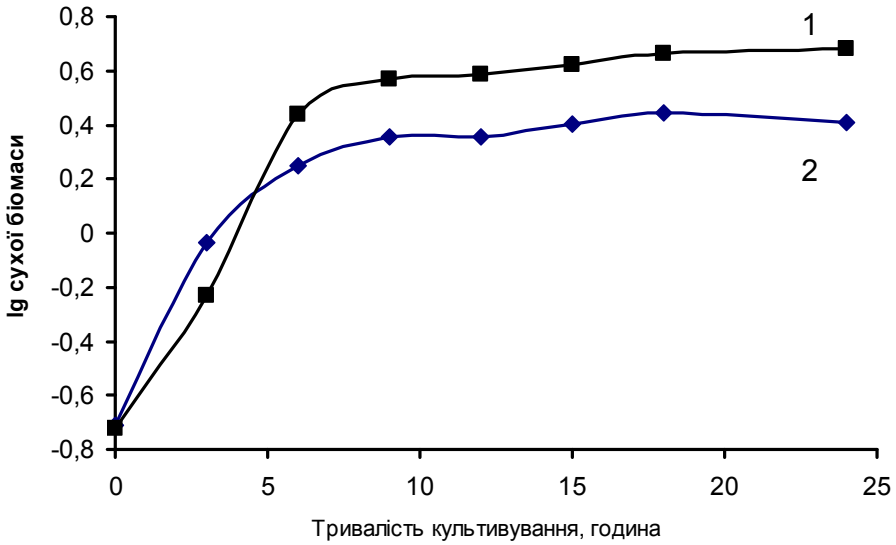

Рис. 1. Криві росту *Pseudomonas aeruginosa* 27 (1) і *Bacillus subtilis* 36 (2)

Fig. 1. The growth curves *Pseudomonas aeruginosa* 27 (1), *Bacillus subtilis* 36 (2)

Отримані криві росту гетеротрофних супутників сульфатвідновлювальних бактерій відповідали загальним закономірностям, описаним для бактерій цих видів у літературі [7, 8].

Для штаму *P. aeruginosa* 27 внесення інокуляту у об'ємі 5% забезпечило вихід у фазу експоненційного росту у першу ж годину культивування (рис. 1). Експоненційна фаза росту тривала 5 год, вихід на стаціонарну фазу росту припав на 8–9-у год. Для штаму *B. subtilis* 36 крива росту характеризувалася певними відмінностями (рис.1). Фаза експоненційного росту тривала 3 год, фаза сповільненого росту, яка тривала з 4-ої до 9-ої години культивування, після якої культура переходила у фазу стаціонарного росту.

Для обох культур бактерій-супутників відмічено відсутність лаг-фази, що свідчить про швидке пристосування клітин до умов середовища та їхній активний фізіологічний стан.

Сульфатвідновлювальні бактерії продукують значну кількість сірководню, який вступаючи у взаємодію з наявними у середовищі іонами Fe^{2+}, утворює нерозчинні компоненти, що можуть заважати визначенню біомаси. Тому фази росту цих бактерій визначали за кількістю клітин.

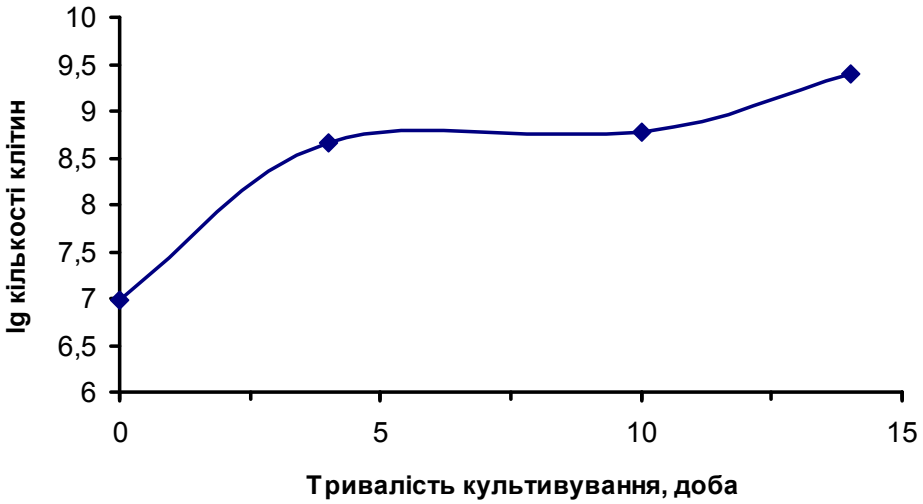

Рис. 2 Крива росту сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio sp.* 10.

Fig. 2 The growth curve of the sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio sp.* 10

Ріст сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio* sp. 10 характеризувався наявністю трьох фаз росту (рис. 2). Відмічено відсутність лаг-фази, а фаза експоненційного росту тривала протягом 4-ох діб. На 5-у добу спостерігали сповільнення росту та вихід на стаціонарну фазу росту. Втім на 14-у добу знову було помітно збільшення кількості клітин на 7%.

Отже, за отриманими кривими росту були визначені основні фази розвитку окремих популяцій сульфідогенного мікробного угруповання. Оцінку та порівняння ростових параметрів складових угруповання проводили за накопиченням білка цими штамами, як це було показано для інших штамів мікроорганізмів [13, 10].

На середовищі Постгейта «В» штам *Desulfovibrio sp.* 10 продукував доволі високу кількість білка (рис. 3). За перші 3 доби культивування кількість білка збільшилася з 280 до 910 мкг/мл, а на 10-у добу до 1090 мкг/мл. Накопичення сірководню у культуральній рідині деякою мірою співпало з ростом сульфатвідновлювальних бактерій. Протягом 7 діб встановлено поступове накопичення сірководню від 102±4,59 мг/л до 230±10,3 мг/л. Проте, на 10-у добу культивування помічено значне збільшення продукування сірководню, яке сягнуло 334±14,03 мг/л (рис. 3), що за часом співпало з максимальним накопиченням білка у клітинах, і з максимальною кількістю клітин у стаціонарній фазі росту. Подальший ріст культури сульфатвідновлювальних бактерій супроводжувався зменшенням накопичення сірководню і білка, що можливо пов'язано із зниженням життєздатності клітин, зумовленим вичерпанням поживних речовин.

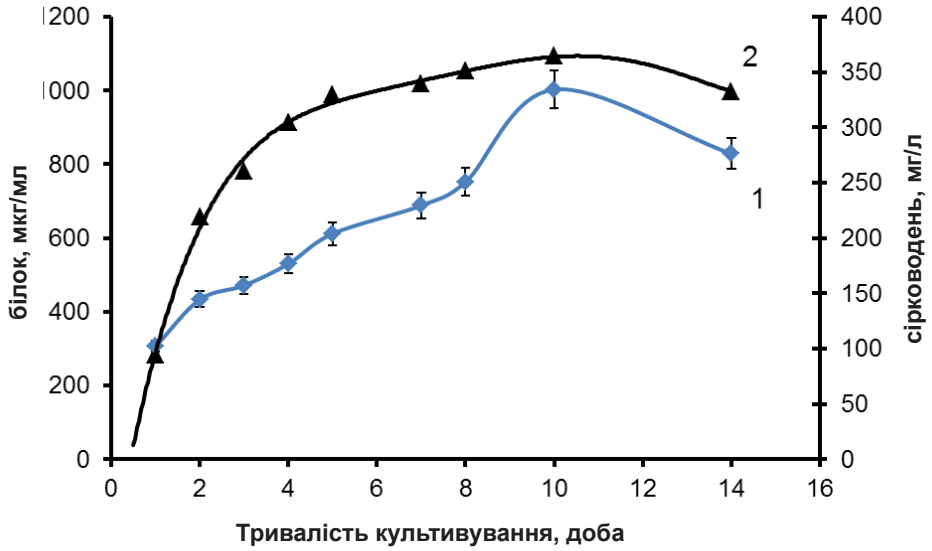

Рис. 3 Динаміка накопичення білка і сірководню клітинами *Desulfovibrio sp.* 10
1 — сірководень, 2 — білок.

Fig 3. Dynamics of the protein productivity and the hydrogen sulfide accumulation by the *Desulfovibrio sp.* 10 cells
1 — hydrogen sulfide, 2 — protein

Утворення сірководню, внаслідок процесів сульфатредукції, є невід'ємною метаболічною властивістю сульфатвідновлювальних бактерій. Сірководень є одним із корозійних метаболітів і має пригнічувальну дію на розвиток мікроорганізмів більшості функціональних груп [9]. Тому в природних умовах, за розвитку мікробного угруповання, як цілісної системи, у ньому функціонують види мікроорганізмів, стійкі до дії сірководню, як наприклад ацидофобні тіонові бактерії. Крім того, розвиток бактерій, чутливих до дії сірководню, може припадати на перші доби функціонування угруповання, коли останній ще не накопичується [4].

Отже, виділені нами супутники сульфатвідновлювальних бактерій здатні пристосовуватися до функціонування у даному сульфідогенному угрупованні.

Найбільшу кількість білка, що накопичували клітини бактерій *P. aeruginosa* 27 (до 1700 мкг/мл) відмічено на 10—12 години культивування (рис. 4). Клітини штаму *B. subtilis* 36 повільніше накопичували білок. Максимальні значення (1020 мкг/мл) спостерігали на 15—18 години культивування. Якщо порівняти накопичення білка у стаціонарній фазі росту сульфатвідновлювальними бактеріями та їх супутниками (рис. 3, 4), то перші продукували білок на рівні зі своїми супутниками. Максимальне значення складало 1090 мкг/мл.

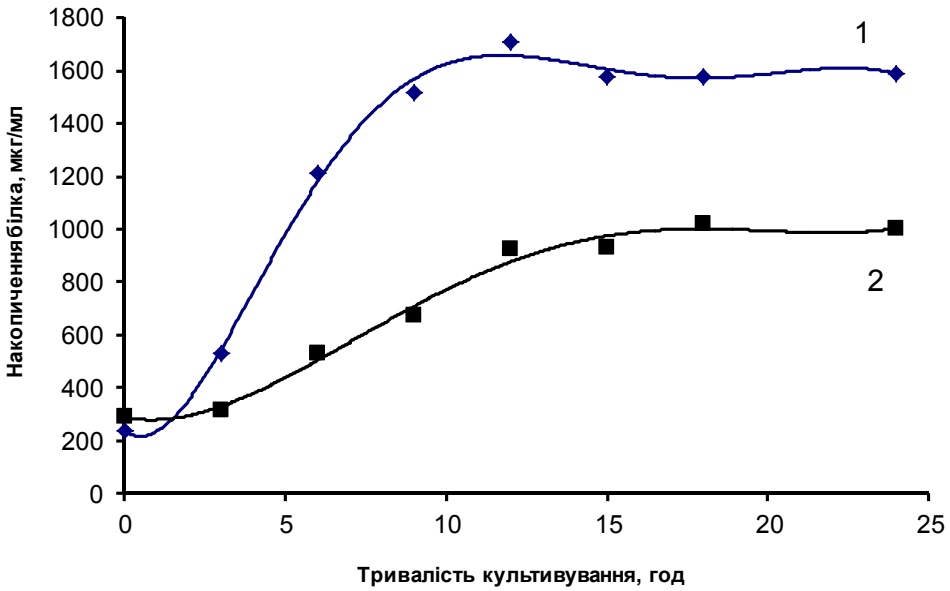

Рис. 4. Динаміка накопичення білка штамами *Pseudomonas aeruginosa* 27 (1) і *Bacillus subtilis* 36 (2)

Fig 4. Dynamics of the protein productivity by strain *Pseudomonas aeruginosa* 27 (1), *Bacillus subtilis* 36 (2)

Висока продуктивність білка пояснюється тим, що бактерії культивували на оптимальних для них середовищах, якими є м'ясо-пептонний бульйон та середовище Постгейта «В». Вибір оптимальних середовищ для культивування досліджуваних штамів дав змогу оцінити за цих умов ростові характеристики членів сульфідогенного угруповання (табл. 1).

Таблиця 1

Параметри росту компонентів сульфідогенного мікробного угруповання

Table 1

Growth parameters of the sulfidogenic microbial community compounds

Штам	Константа швидкості поділу v, год-1	Швидкість росту μ, год-1 за білком	Час подвоєння Td, год
Desulfovibrio sp. 10	0,069	0,0212	14,49
Pseudomonas aeruginosa 27	-	0,300	2,31
Bacillus subtilis 36	-	0,149	4,65

Примітка: «-» не визначали

При порівнянні питомих швидкостей росту за накопиченням білка компонентів сульфідогенного мікробного угруповання встановлено, що питомі швидкості росту гетеротрофних супутників *P. aeruginosa* 27 та *B. subtilis* 36 є на порядок вищими порівняно з клітинами *Desulfovibrio sp*. 10. Тому бактерії-супутники можуть бути піонерами у заселенні металевих поверхонь. Сульфатвідновлювальні бактерії, яким властива нижча питома швидкість росту, очікувано будуть переважати на наступних стадіях розвитку сульфідогеннного мікробного угруповання.

Отже, ростові характеристики окремих популяцій сульфідогенного мікробного угруповання вказують, що асоціативні супутники сульфатвідновлювальних бактерій *P. aeruginosa* 27 та *B. subtilis* 36 характеризуються високими питомими швидкостями росту (0,300 год$^{-1}$ та 0,149 год$^{-1}$, відповідно), які перевищують швидкість поділу клітин штаму *Desulfovibrio sp*. 10 у 7—14 разів. Нами висловлено припущення, що різниця у швидкостях росту може слугувати умовою для сукцесії при формуванні корозійно-агресивного мікробного угруповання.

Ці припущення узгоджуються з даними попередніх досліджень, де нами показано, що домінування гетеротрофних бактерій в сульфідогенному угрупованні сформованому у біоплівці на сталі припадало на 3—9 години. Розвиток сульфатвідновлювальних бактерій відмічено лише на 24 годину, а максимальна їх кількість була зафіксована на 10-у добу культивування асоціації [12].

Втім, у природі оптимальних умов для окремого виду бактерій досягти неможливо. В угрупованні бактерії, взаємодіючи між собою, мають широкі адаптивні можливості, більш високу життєздатність, і тому легко пристосовуються до несприятливих умов існування.

ЛІТЕРАТУРА

1. Андреюк К.І., Козлова І.П., Коптєва Ж.П., Піляшенко-Новохатний А.І., Заніна В.В., Пуріш Л.М. Мікробна корозія підземних споруд. - Київ: Наук. Думка. — 2005. — 258 с.

2. *Антипчук А.Ф. Кіреєва І.Ю.* Водна мікробіологія: навч. посібник — Київ: Кондор. — 2005. — 256 с.

3. *Асауленко Л.Г., Пуріш Л.М., Абдуліна Д.Р.* Таксономічне положення окремих представників сульфідогенного корозійно-агресивного мікробного угруповання // Мікробіол. журн. — 2010. — 72, № 4. — С. 3—10.

4. *Заварзин Г.А., Колотилова Н.Н.* Введение в природоведческую микробиологию. — М: Книжный дом «Университет», 2001. — 256 с.

5. *Лурье Ю.Ю.* Унифицированные методы анализа вод. — М.: Химия. — 1971. — 194 с.

6. *Методы* общей бактериологии: В 3 т. / Под ред. Ф. Герхардта. — М.: Мир, 1983. — Т. 1. — 536 с.; Т. 2. — 470 с.; — Т. 3. — 263 с.

7. *Милько Е.С., Хабибуллин С.С., Николаев Ю.А., Козлова А.Н., Эль-Регистан Г.И.* Динамика роста и состава популяций смешанных культур R-, S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиология. — 2005. — 74, № 4. — С. 475—482.

8. *Могильная О.А., Крылова Т.Ю., Попова Л.Ю.* Морфологическая характеристика и динамика развития биопленок трансгенного штамма *Bacillus subtilis* // Микробиология. — 2003. — 72, № 4. — С. 569—570.

9. *Павлова Ю.О.* Морфолого-фізіологічні властивості бактерій родів *Chromatium* і *Thiocystis* виділених з водойм збагачених сірководнем: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Львів, 2008. — 21 с.

10. *Петрова О.Е., Давыдова М.Н., Тарасова Н.Б., Мухитова Ф.К.* Сульфатредуцирующие бактерии в биологической переработке промышленных отходов, содержащих нитроцеллюлозу // Вестник Моск. Ун-та. Серия 2. Химия. -2003. — 44, № 1. — С. 43—45.

11. *Печуркин Н.С.* Популяционная микробиология. / под ред. И.И. Гительзон — Новосибирск: Наука, 1978. — 277 с.

12. *Пуріш Л.М., Асауленко Л.Г.* Динаміка сукцесійних змін у сульфідогенній мікробній асоціації за умов формування біоплівки на поверхні сталі // Мікробіол. журн. — 2007. - 69, № 6. — С. 19—25.

13. *Франк Ю.А.* Выделение и изучение сульфатредуцирующих бактерий из экосистем, подверженных влиянию металлургических предприятий: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Томск, 2006. — 23 с.

14. *Шлегель Г.* Общая микробиология. пер с нем. - М.: Мир, 1987. - 567 с.

Д.Р. Абдулина, Л.Г. Асауленко, Л.М. Пуриш

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев, ГСП Д03680, Украина,
тел.: +38 (044) 526 34 79, e-mail: adara@ukr.net

ДИНАМИКА РОСТА ПОПУЛЯЦИЙ СУЛЬФИДОГЕННОГО МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА

Реферат

Определены ростовые характеристики отдельных микробных популяций сульфидогенного микробного сообщества, сформированного в биопленке на стали, в состав которого входят сульфатвосстанавливающие бактерии, а также их бактерии-спутники. Спутники сульфатвосстанавливающих бактерий *P. aeruginosa* 27 и *B. subtilis* 36 характеризуются высокими удельными скоростями роста (0,300 час$^{-1}$ и 0,149 час$^{-1}$, со-

ответственно), превышающими скорость роста штамма сульфатвосстанавливающих бактерий *Desulfovibrio sp.* 10 в 7—14 раз. Высказано предположение о том, что разница в скоростях роста может быть одним из условий для сукцессии при формировании коррозионно-агрессивного микробного сообщества.

Ключевые слова: сульфидогенное микробное сообщество, сульфатвосстанавливающие бактерии, ассоциативные бактерии, параметры роста.

D.R. Abdulina, L.G. Asaulenko, L.M. Purish

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Zabolotny Str., Kyiv, D03680, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 34 79, e-mail: adara@ukr.net

GROWTH DYNAMICS OF THE SULFIDOGENIC MICROBIAL COMMUNITY POPULATIONS

Summary

It has obtained the growth characteristics of the separate microbial populations of a sulfidogenic microbial community, which was formed in a biofilm on the steel surface, and consists of sulfate-reducing-bacteria and their associative satellites. Associative bacteria *P. aeruginosa* 27 and *B. subtilis* 36 are characterized by the high growth rates (0,300h^{-1} and 0,149 h^{-1}, consequently). They are having higher growth rates in 7—14 times more than *Desulfovibrio sp.* 10 cells have. It has been expressed the opinion that the difference in the growths rates could be one of a factor for succession during the formation of the corrosive-aggressive microbial community.

Key words: sulfidogenic microbial community, sulfate-reducing bacteria, associative bacteria, growth parameters.

Одержано 28.07.2011.