

КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ ПЕРИФИТОНА СИСТЕМ ГИДРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ

Дорошенко Ю.В.

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»
просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: julia_doroshenko@mail.ru
Поступила в редакцию: 29.07.2019

Аннотация. В работе приведён сравнительный анализ некоторых характеристик роста бактериальных и дрожжевых культур, выделенных из перифитона систем гидробиологической очистки морских вод. Исследование микроорганизмов в этом аспекте представляет интерес для выявления их роли в процессах самоочищения и трансформации загрязняющих веществ. В эксперименте использовали чистые культуры представителей массовых родов бактерий и дрожжей перифитона. Установлено, что средняя скорость прироста биомассы для всех бактериальных культур была максимальной через 50 ч эксперимента (0,98-1,28 %/ч), а затем снижалась до (0,35-0,46 %/ч). Скорость прироста биомассы дрожжей также максимальна в первые 50 ч (1,62-1,72 %/ч), к концу эксперимента составляла (0,55-0,58 %/ч). Изучение кинетики роста морских дрожжей *Candida* показало, что их скорость роста выше, чем у бактерий. Значения прироста биомассы у дрожжей с течением времени возрастали. Количественно подтверждено, что окрашенные формы дрожжевых организмов размножаются менее интенсивно и это может влиять на частоту их встречаемости. Полученные результаты могут быть использованы для расчётов самоочищающей способности акваторий, в которых расположены или будут расположены системы гидробиологической очистки морских вод. При работе над активными ассоциациями микроорганизмов-деструкторов загрязняющих веществ, так же необходимо учитывать скорость и характер их роста.

Ключевые слова: кинетические характеристики роста, морские дрожжи, бактерии, системы гидробиологической очистки, Чёрное море.

ВВЕДЕНИЕ

Возможность целенаправленного использования морских организмов для очистки морской воды и оздоровления прибрежных акваторий была сформулирована О.Г. Мироновым ещё в 1969 г. [1]. Последующие многолетние исследования заложили теоретическую базу разработки систем гидробиологической очистки (СГО), в основе которых лежат естественные процессы самоочищения морской среды [2, 3].

Под системой гидробиологической очистки понимается сформированное на искусственных субстратах, размещённых в толще воды, сообщество гидробионтов, характерное для данного района моря и способствующее улучшению экологического состояния морской акватории [2].

Наиболее обстоятельно развитие микрообрастания в Чёрном море было изучено Ю.А. Горбенко [4]. Им установлена следующая последовательность колонизации искусственных субстратов: бактерии → дрожжи → гетеротрофные жгутиконосцы, почти одновременно с ними – диатомовые водоросли и инфузории. В других морях сукцессии микрообрастания изучены менее подробно. Однако общий порядок оседания микроорганизмов из планктона оказывается близким к указанному.

Установлены общие процессы, которые лежат в основе биообрастания естественных и искусственных твердых поверхностей любыми организмами: микроорганизмами, беспозвоночными животными, а также макроводорослями. К ним относятся миграции (активные и пассивные), оседание и прикрепление расселительных форм, развитие и рост осевших на поверхность особей [5]. Эти процессы последовательно сменяют друг друга при развитии микро- и макрообрастания; следовательно, морское обрастание содержит практически все группы сидячих организмов, как животных, так и растений. Кроме того, в зарослях, образуемых сидячими формами, всегда встречаются и подвижные животные, но они никогда не являются руководящими. В обрастании всегда присутствуют бактерии, которые первыми появляются на чистой поверхности, помещённой в воду. Для развития обрастания первичная плёнка, состоящая из бактерий и микроскопических водорослей, играет большую роль, так как способствует или препятствует поселению многих более крупных обростателей [6], на поверхности которых, в свою очередь, развиваются микроорганизмы.

При влиянии различных экологических факторов, как антропогенных, так и биотических, происходят явные отклонения от общей схемы формирования перифитона [7].

Регулярные наблюдения за развитием и функционированием сообщества обрастания СГО убедительно доказывают целесообразность их использования в зонах экологического риска. Была определена численность бактерий перифитона СГО [3]. Однако для выявления роли микроорганизмов перифитона (бактерий и дрожжей) в процессах самоочищения и трансформации загрязняющих веществ необходимо иметь представление о скорости и характере их роста.

Цель работы - изучить кинетические характеристики бактерий и дрожжей перифитона СГО с помощью автоматического анализатора «BioScreen C».

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Система анализа кривых роста «BioScreen C» напрямую измеряет рост микроорганизмов. По мере роста микроорганизмов они увеличивают мутность среды. Измеряя мутность этой среды во времени, можно получить кривую оптической плотности. Кривая отражает рост (увеличение концентрации) интересующего организма. Для работы на автоматическом анализаторе «BioScreen C» с программой BIORTN использовали чистые культуры бактерий и дрожжей, выделенные из перифитона СГО (СГО-1, СГО-2) [8, 9]. За сутки до постановки эксперимента культуры пересевались. Затем из пробирки капилляром закапывали пересевленную культуру в ячейки плашки в пяти повторностях; объём каждой ячейки составлял 0,02 мл. Прибор использовался нами как индикаторный, т.е. максимальная величина оптической плотности принималась за 100 % и относительно неё рассчитывались остальные параметры роста.

Для каждой культуры определяли следующие параметры: относительную максимальную плотность (биомассу) культуры ($V_{\max. \text{отн.}}$, %); относительный прирост ($\Delta V_{\max. \text{отн.}}$, %); среднюю скорость прироста ($V_{\text{ср}} = \Delta V_{\max. \text{отн.}} / \Delta t$).

Длительность эксперимента составляла 150 ч, а данные абсорбции снимали каждые 50 ч. В эксперименте использовали представителей массовых родов бактерий (*Marinococcus*, *Vibrio*, *Pseudomonas*) и дрожжей (*Candida*, *Rhodotorula*).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из участков Севастопольской бухты, подверженным антропогенному воздействию, является акватория Нефтегавани, расположенная в глубине бухты и функционирующая с 1903 г. [2]. В 90-х годах прошлого столетия в Нефтегавани были размещены два варианта систем гидробиологической очистки морской воды. Первая система (СГО-1) представляет собой капроновую сеть (дель рыболовецкого трала), закреплённую на подводной части свай (глубина 0-2 м) нефтеналивного пирса. Ячейка сети составляет 5×5 см, протяжённость 4 м. Вторая система (СГО-2) сконструирована на основе секций сетевого заграждения, подводная часть которой состоит из стальных колец диаметром 25 см и располагается от поверхности моря до дна (глубина 5-6 м), общая протяжённость системы 50 м.

К началу нашего исследования на системах уже сформировалось и функционировало сообщество обрастания, состоящее преимущественно из мидий, характерное для Севастопольской бухты. Несмотря на выполненную другими исследователями [2, 3] оценку фильтрационной активности систем, а также бентосных сообществ в районе их размещения, детальное изучение микрофлоры перифитона этих систем не проводилось.

Автоматический анализатор «Bioscreen C» позволяет более детально изучать особенности физиологии микроорганизмов, в частности, характер роста культур бактерий и дрожжей. Приведём сравнительный анализ кинетических характеристик их роста. Относительная максимальная биомасса (плотность) отмечена через 100 ч у культуры, принадлежащей к роду *Vibrio*. В первые 50 ч эксперимента максимальная плотность также наблюдалась для рода *Vibrio* и составляла 79,4 %, а минимальная – для *Pseudomonas* (рис. 1). Через 150 ч

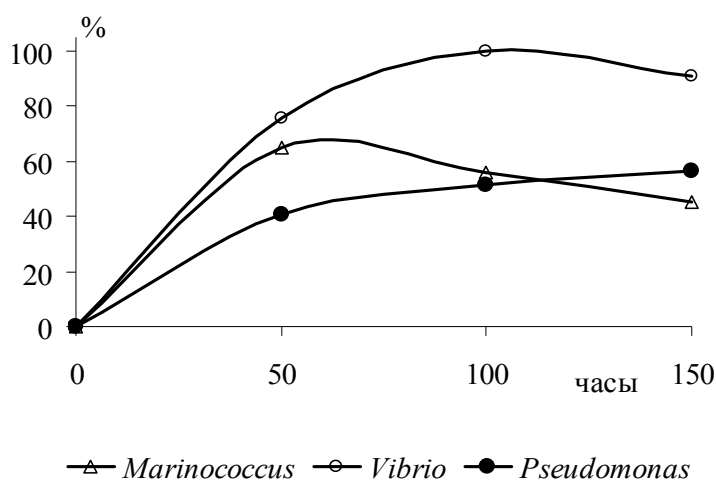


Рисунок 1. Рост относительной биомассы бактерий перифитона в эксперименте

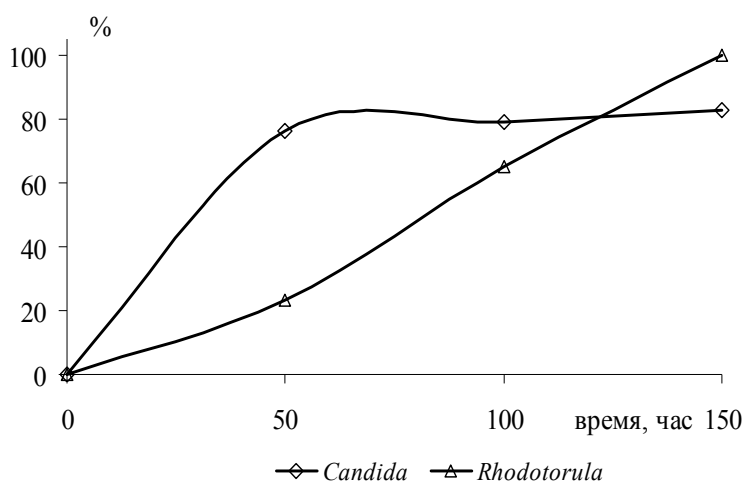


Рисунок 2. Рост относительной биомассы дрожжей перифитона в эксперименте

Таблица 1. Ростовые характеристики исследуемых культур бактерий и дрожжей

Культура	Относительный прирост биомассы $\Delta B_{\text{макс. отн.}}, \%$			Средняя скорость прироста $V_{\text{ср. отн.}} = \Delta B_{\text{макс. отн.}} / \Delta t$		
	через 50 ч	через 100 ч	через 150 ч	через 50 ч	через 100 ч	через 150 ч
	<i>Marinococcus</i>	60,1	56,3	51,9	1,20	0,56
<i>Vibrio</i>	64,2	70,5	68,6	1,28	0,71	0,46
<i>Pseudomonas</i>	49,1	55,4	57,7	0,98	0,55	0,38
<i>Candida</i>	83,2	83,8	84,5	1,7	0,8	0,6
<i>Rhodotorula</i>	43,1	79,6	86,7	0,9	0,8	0,6

эксперимента максимальная плотность была у представителя рода *Vibrio* – 91,1 %. Следует отметить, что у бактерий рода *Pseudomonas* выявлена тенденция к увеличению плотности культуры со временем, в отличие от других культур, где после 150 ч культивирования у бактерий наблюдали замедление роста. Такой рост биомассы ранее был отмечен только для дрожжевых культур [8].

Для дрожжевых культур максимальное значение плотности отмечено через 150 ч эксперимента у *Rhodotorula*. Однако в первые двое суток рост относительной биомассы составил только 23,4 % (рис. 2).

Первые работы по изучению морских дрожжей показали, что их скорость роста выше, чем у бактерий [8].

Относительный прирост биомассы для *Vibrio* составил от 64 до 70 %, причём максимум отмечен через 100 ч. Для рода *Marinococcus* максимальные значения зафиксированы уже через 50 ч, а к концу эксперимента они постепенно снижались. Однако прирост биомассы для *Pseudomonas* возрастал с 49,1 до 57,7 % (табл. 1).

Установлено, что средняя скорость прироста биомассы для всех бактериальных культур была максимальной через 50 ч эксперимента (0,98-1,28 %/ч), а затем она постепенно снижалась (0,35-0,46 %/ч). Скорость прироста биомассы дрожжей также максимальна в первые 50 ч (1,62-1,72 %/ч), и уменьшается до 0,55-0,58 %/ч.

Значения прироста биомассы у дрожжей с течением времени возрастали, даже на седьмые сутки. Тогда как для бактерий подобное явление отмечено только для представителя рода *Pseudomonas*. При этом средняя скорость прироста была в два раза ниже к концу эксперимента. Полученные результаты для *Candida* были идентичны определённым ранее для ряда дрожжевых культур [8]. Исключение составляет *Rhodotorula*, что согласуется с литературными данными. Ранее [10] выявлено, что окрашенные формы дрожжевых организмов размножались менее интенсивно. Следовательно, скорость роста отдельных видов дрожжей может влиять на частоту их встречаемости.

Полученные результаты могут быть использованы для расчётов самоочищающей способности акваторий, в которых расположены или будут расположены системы гидробиологической очистки морских вод. При работе над активными ассоциациями микроорганизмов-деструкторов загрязняющих веществ в водных бассейнах, так же необходимо учитывать скорость и характер их роста.

ВЫВОДЫ

Максимальная относительная плотность культуры бактерий отмечена для рода *Vibrio*, который является доминирующим в перифитоне СГО. Скорость прироста для всех бактерий максимальна в первые 50 ч (0,98-1,28 %/ч), а затем постепенно снижается (0,35-0,46 %/ч).

Скорость прироста биомассы дрожжей также максимальна через двое суток (1,62-1,72 %/ч), и уменьшается до 0,55-0,58 %/ч к концу эксперимента на седьмые сутки. Прирост биомассы у дрожжей, в отличие от большинства бактерий, с течением времени возрастает.

Количественно подтверждено, что окрашенные формы дрожжевых организмов размножаются менее интенсивно и это может влиять на частоту их встречаемости.

Работа выполнена в рамках госзадания по теме ФИЦ ИнБЮМ № АААА-А18-118020890090-2.

Список литературы / References:

1. Миронов О.Г. К вопросу о самоочищении морской воды от нефтепродуктов. *Гидробиологический журнал*, 1969, т. 5, № 4, с. 89-93. [Mironov O.G. On the issue of self-cleaning of sea water from oil product. *Hydrobiological journal*, 1969, vol. 5, no. 4, pp. 89-93 (In Russ.)]
2. Mironov O.G., Schekaturina T.L., Alyomov S.V. Perspectives of using of marine polluted water cleaning hydrobiological method for sanitation and improvement of the coastal aquatoria state. *Oil spills in the Mediterranean and Black Sea regions: 2-nd Intern. Conf.*, 31st Oct.-3rd Nov. 2000, Istanbul, 2000, pp. 187-195.
3. Миронова О.Г., Алёмова С.В. *Санитарно-биологические исследования прибрежных акваторий юго-западного Крыма в начале XXI века*. Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2018, 276 с. [Mironov O.G., Alyomov S.V. *Sanitary and biological studies of the south-western Crimea coastal waters at the beginning of XXI century*. Simferopol: PP «ARIAL», 2018, 276 p. (In Russ.)] DOI:10.21072/978-5-907118-89-8.
4. Горбенко Ю.А. *Ecology and practical importance of marine microorganisms*. К.: Наук. думка, 1990, 160 с. [Gorbenko Yu.A. *Analysis of dosage forms. Practical Guide*. L.: Nauk. dumka, 1990, 160 p. (In Russ.)]
5. Раилкин А.И. *Процессы колонизации и защита от биообрастания*. СПб: Изд-во С.-Петербург. Ун-та, 1998, 272 с. [Railkin A.I. *The process of colonization and protection from biofouling*. SPb.: Izd-vo S-Peterburg. Un-ta, 1998, 272 p. (In Russ.)]
6. Зевина Г.Б. *Биология морского обрастания*. М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1994, 135 с. [Zevina G.B. *Biology of marine fouling*. M.: Izd-vo Mosk. Un-ta, 1994, 135 p. (In Russ.)]
7. Маврин А.С., Быкова С.Н., Виноградов Г.А., Жуков Б.Ф. Структурно-функциональные преобразования микроперифитонных сообществ под влиянием биотических факторов. *Биол. внутр. вод*, 2001, № 4, с. 58-65. [Mavrin A.S., Bukova S.N., Vinogradov G.A., Zhukov B.F. Structural and functional transformations of microperiphytic communities under the influence of biotic factors. *Inland water biology*, 2001, no. 4, pp. 58-65 (In Russ.)]
8. Дорошенко Ю.В. Исследование ростовых характеристик бактериальных и дрожжевых культур перифитона систем гидробиологической очистки морских вод. *Экология моря*, 2008, вып. 76, с. 49-53. [Doroshenko Yu.V. Investigation of the growth characteristics of bacteria and yeasts of periphyton of systems of hydrobiological cleaning of marine waters. *Marine ecology*, 2008, iss. 76, pp. 49-53 (In Russ.)]
9. Дорошенко Ю.В. Морские дрожжи в сообществе обрастаний систем гидробиологической очистки. *Экосистемы, их оптимизация и охрана*, 2014, вып. 11, с. 219-222. [Doroshenko Yu.V. Marine yeasts in the fouling communities of systems of hydrobiological cleaning. *Ecosystems, their optimization and protection*, 2014, iss. 11, pp. 219-222 (In Russ.)]
10. Новожилова М.И. *Аспорогенные дрожжи и их роль в водоемах*. Алма-Ата: Наука, 1979, 200 с. [Novozhilova M.I. *Asporogenic yeasts and its role in water reservoir*. Alma-Ata: Nauka, 1979, 200 p. (In Russ.)]

THE KINETIC GROWTH CHARACTERISTICS OF MICROORGANISMS OF PERIPHYTHON OF THE HYDROBIOLOGICAL CLEANING SYSTEMS**Doroshenko Yu.V.**

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS
Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia, e-mail: julia_doroshenko@mail.ru

Abstract. The comparative analysis of some growth characteristics of the periphyton bacterial and yeast cultures of hydrobiological cleaning systems of sea water is given. The study of microorganisms in this aspect is of interest to identify their role in the processes of self-purification and transformation of pollutants. Pure cultures of representatives of mass genera of bacteria and periphyton yeasts were used in the experiment. It was found that the average biomass growth rate for all bacterial cultures was maximum after 50 hours of the experiment (0.98-1.28 % / h), and then decreased to 0.35-0.46 % / h. The yeast biomass growth rate is also maximum in the first 50 hours (1.62-1.72 % / h), by the end of the experiment it was 0.55-0.58 % / h. The growth kinetics of *Candida* sea yeast has been studied. It is shown that their growth rate is higher than that of bacteria. The values of biomass growth in yeasts have increased over time. It has been quantitatively confirmed that the colored forms of yeast organisms reproduce less intensively and this can affect the frequency of their occurrence. The obtained results can be used to calculate the self-cleaning ability of the water areas in which the hydrobiological cleaning systems are located or will be located. When working on active associations of microorganisms-destroyers of pollutants, it is also necessary to take into account the speed and nature of their growth.

Key words: *kinetic growth characteristics, marine yeasts, bacteria, hydrobiological cleaning systems, Black sea.*