

УДК 579:551.352(262.5)

В. П. Чекалов

Інститут біології південних морів ім. О. О. Ковалевського НАН України, м. Севастополь

МЕТОДИЧНІ АСПЕКТИ ОБЛІКУ ЧИСЕЛЬНОСТІ БАКТЕРІОБЕНТОСУ В УМОВАХ СЕЗОННОГО КОЛИВАННЯ ТЕМПЕРАТУР

Розглянуто доцільність використання коефіцієнта температурної корекції у разі визначення чисельності бактерій в умовах, близьких до природних, урахувавши також акваторії полярних зон. У теплий період року чисельності потенційно життєздатної та фізіологічно активної мікрофлори зазвичай збігаються. При низьких температурах активно може виявитися одна зі ста клітин. Культивування посівів при нетипових для холодного часу року температурах (+20...+25 °С) спричинює, як правило, викривлення результатів. Запропоновано використовувати як поправний коефіцієнт відсоткове співвідношення колоній, що були вперше виявлені візуально на чашках «холодної» інкубації, до чисельності мезофільних форм за той самий інтервал часу. Для дослідження анаеробної та аеробної складових бактеріального угруповання запропоновано модифіковане середовище Вільсона – Блера.

В. П. Чекалов

Інститут биологии южных морей им. А. О. Ковалевского НАН Украины, г. Севастополь

МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ УЧЕТА ЧИСЛЕННОСТИ БАКТЕРИОБЕНТОСА В УСЛОВИЯХ СЕЗОННОГО КОЛЕБАНИЯ ТЕМПЕРАТУР

Рассмотрена целесообразность использования коэффициента температурной коррекции при учете численности бактерий в условиях, приближенных к природным, в том числе в акваториях полярных зон. В теплый период года численности потенциально жизнеспособной и физиологически активной микрофлоры обычно совпадают. При пониженных температурах активной может оказаться лишь одна из ста клеток. Культивирование посевов при нехарактерных (+20...+25 °С) для холодного времени года температурах приводит, как правило, к искаженным результатам. Предложено использовать в качестве поправочного коэффициента процентное соотношение колоний, впервые обнаруженных визуально на чашках «холодной» инкубации, к численности мезофильных форм за тот же интервал времени. Для исследования анаэробной и аэробной составляющих бактериального сообщества предлагается применять модифицированную среду Вильсона – Блера.

V. P. Chekalov

O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Sevastopol

METHODICAL ASPECTS OF BACTERIOBENTHOS INVENTORY AT CONDITIONS OF TEMPERATURE SEASONAL FLUCTUATION

The appropriateness of using the coefficient of temperature correction for the censuring of bacteria in natural conditions, including polar zone water areas, is considered. The numbers of potentially viable and physiologically active microflora in the warm period of year usually coincide. Only one cell in a hundred can be active under conditions of the lower temperature. As a rule, the cultivation of bacterial inoculations at

temperatures (+20...+25 °C) which uncharacteristic for a cold season gives the skewed results. A percentage ratio of the number of colonies firstly found out visually under "cold" incubation to the number of colonies of mesophilic forms at the same time lag is proposed to use as a correction coefficient. The modified iron-sulfite agar (Wilson-Blair nutrient medium) is offered for research of anaerobic and aerobic bacterial community.

Вступление

Изменение условий окружающей среды способно вызывать у бактерий как биологических объектов состояние стресса [6; 12]. Температура, являясь мерой интенсивности энергии любой системы, оказывает доминирующее действие на все биологические процессы [11]. Экспериментально доказано, что в каждом случае культивирования разное, иногда довольно значительное, число бактерий будет находиться в экологически обусловленном жизнеспособном, но некультурабельном состоянии (ЖНС) [7; 9]. При изучении скоростей роста бактерий *in situ* в пресноводном ручье было установлено, что зимой (0...–5 °C) темпы генерации снижались в 8–20 раз [8]. При низкой температуре воды (+4 °C) динамика прироста численности микроорганизмов сильно растянута во времени, но максимум численности при этом через 18 суток оказался на 1/3 больше, чем при высокой [5].

Oliver с соавт. [10] исследовали переход в некультурабельное состояние (ЖНС) клеток *Vibrio vulnificus*, помещенных в естественные эстуариевые (устья рек) воды, в течение зимних и летних месяцев. Клетки, инокулированные в мембранные диффузионные камеры, вступали в ЖНС состояние в январе и феврале, когда температура воды была низкой (в среднем < +15 °C). Напротив, когда клетки в состоянии ЖНС были помещены в те же условия в более теплое время – с августа до ноября (что составляет среднюю водную температуру приблизительно +21 °C), бактерии подвергались быстрой (обычно в пределах 24 ч) реверсии в культурабельное состояние. Это связано с тем, что у прокариотов для поддержания необходимого уровня метаболизма при различных условиях окружающей среды существуют механизмы активации дополнительных форм ферментов, сходных по функции, но отличающихся молекулярной массой и приспособленностью к различным температурам [6]. Ферменты, представленные только одной формой, не смогли бы осуществлять катализ при таких изменениях диапазона температур. Один из важных выводов, которые можно сделать, учитывая вышесказанное – это то, что пробы, взятые из окружающей среды, могут содержать бактерии, пребывающие в своеобразном физиологическом анабиозе.

Однако на практике, при учете численности микроорганизмов, в частности гетеротрофов, температурный режим культивирования посевов довольно часто не соответствует естественным условиям среды обитания. Поэтому термостатирование их при +20...+25 °C дает реальные результаты лишь в летне-осенний период, и только до глубины залегания термоклина, в то время как большая часть и грунтов и водной толщи располагается в более холодных условиях. В хронически холодных полярных водах практически единственными представителями микрофлоры являются психрофильные формы.

Цель данной работы – оценить соотношение между приростом числа колоний в посевах, культивируемых параллельно при оптимальных температурах, и в условиях, близких к естественным. С целью оптимизации набора необходимых питательных сред рассмотрена возможность применения модифицированной среды Вильсона – Блера, предназначенной для выявления анаэробной сульфатредуцирующей микрофлоры, в качестве универсальной при учете как анаэробных, так и аэробных бактерий.

Материал и методы исследований

Для изучения влияния температуры на темпы формирования колоний бактерий на плотных средах в январе (станция 5) и марте (станция 4) 2006 г. отобраны пробы донных отложений в центральной части бухты Круглая в районе г. Севастополь. В границах этих станций выделены зоны сульфурет (4ц и 5ц) с очагами замороз донных макрофитов (зостеры), а также прилегающие к ним фоновые участки с окислительными условиями среды (4ф и 5ф).

Измерение окислительно-восстановительного потенциала производили при помощи универсального иономера ЭВ-74 сразу же после доставки проб в лабораторию.

Содержание органического вещества определяли гравиметрическим методом при прокаливании навесок в муфельной печи при температуре 500 °С.

В качестве материала для исследования ростовых возможностей модифицированной среды Вильсона – Блера использовали донные отложения Балаклавской бухты (пробы 1–6) и глубоководного района восточной части Черного моря (пробы 7–9).

Численность аэробных гетеротрофных микроорганизмов (Аэ) определяли путем глубинного посева разведений донных отложений в среду, предложенную Ю. А. Горбенко [1]. Для выявления анаэробных гетеротрофов (АнАэ) и сульфатредуцирующих бактерий (СРБ), а также при сравнительных посевах одновременно с мясопептонным агаром (МПА) использовали модифицированную стандартную среду Вильсона – Блера. С целью ее адаптации к морским условиям, как и в случае со средой Горбенко, бралась навеска сухой среды в соотношении 1 : 10 от рекомендуемой по прописи. Среды готовили на фильтрованной кипяченой морской воде. Посев осуществляли по методу Л. Д. Штурм [4]. При этом темноокрашенные колонии учитывали как СРБ, а светлые – как анаэробные гетеротрофные бактерии. Ряд посевов термостатировали как при оптимальной температуре (+20...+25 °С), так и при температуре, соответствующей зимнему периоду (+5...+10 °С). Инкубацию при низкой температуре осуществляли в холодильнике. Это имеет смысл, когда температура в месте обитания отличается от оптимума более чем на 10 °С. Часть посевов культивировали при этих режимах поэтапно. Хотя нельзя с полной уверенностью утверждать, что микроорганизмы, выделенные из окружающей среды и растущие при низкой температуре в лабораторных условиях, действительно активны *in situ*, такая экстраполяция, тем не менее, вполне логична [2]. Считается, что физиологически активные бактериальные клетки на плотных питательных средах формируют видимые колонии в среднем через 10–15 суток [3]. Поэтому подсчет числа выросших колоний проводили посуточно в течение 13 суток.

В 2009–2010 гг. во время работы XIV Украинской антарктической экспедиции на станции «Академик Вернадский» отобраны пробы воды на трех станциях в районе о. Галиндез (Южная Атлантика). Для учета численности мезофильных и гипотермических форм гетеротрофных бактерий по 1 см³ из каждой пробы засевали на поверхность стандартной среды МПА с последующей параллельной инкубацией при +21 и +4 °С.

Результаты и их обсуждение

Культивирование посевов при +25 °С способствует формированию видимых колоний гетеротрофов уже через 24 часа, тогда как при +5 °С первые колонии появляются на вторые – пятые сутки (табл. 1). Совпадение же, и для Аэ и для АнА, динамики прироста числа колоний в посевах 10 и 25-градусной инкубации, различающихся, правда, масштабом, можно объяснить соответствием температурным условиям среды обитания. Это именно то значение, которое было зафиксировано при отборе проб. Процентное соотношение колоний, впервые обнаруженных визуально на чашках «хо-

лодной» инкубации к численности мезофильных форм за тот же интервал времени, отражает долю физиологически активных микробных клеток сообщества, которым не требуется времени на адаптацию. То же соотношение, но через 10–12 суток, будет указывать на потенциально возможную в данных температурных условиях активацию клеток. Она в первую очередь определяется наличием и доступностью питательных веществ.

Таблица 1

Посуточное изменение числа колоний аэробных, анаэробных и сульфатредуцирующих (СРБ) гетеротрофных бактерий ($N \times 10^2$, колониеобразующих единиц (КОЕ)/г влажного грунта)

№ стан-ции	Группы бакте-рий	Темпера-турный режим	Время, сутки												
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
5ц	аэробы	+25 °С	2	88	178	432	520	578	578	582	608	628	673	706	715
		+10→+25 °С	0	29	79	90	100	113	120	173*	222	265	298	342	373
		+5→+25 °С	0	0	0	0	3	6	39*	78	187	332	403	451	472
	анаэро-бы	+5 °С	0	0	0	0	3	4	23	43	55	82	94	99	103
		+25 °С	0	1	16	71	104	114	130	140	150	160	162	166	171
		+10→+25 °С	0	0	0	0	3	8	22	26	44*	71	105	129	141
5ф	аэробы	+25 °С	30	227	391	516	614	628	661	694	729	762	767	785	798
		+10→+25 °С	3	15	27	46	93	157	224	365*	465	534	566	586	630
		+10 °С	3	27	66	95	130	161	196	214	236	251	259	263	273
	анаэро-бы	+5→+25 °С	0	0	6	12	25	33	48	191*	401	505	552	579	623
		+5 °С	0	0	4	12	19	28	39	58	108	150	158	187	202
		+25 °С	0	52	102	150	207	211	245	253	266	270	280	292	301
4ц	аэробы	+10→+25 °С	0	0	0	0	2	6	18	50	89*	124	162	189	207
		+25 °С	119	478	685	891	1022	1130	1175	1207	1222	1226	1228	1262	–
	анаэро-бы	+10→+25 °С	0	5	114	276	375	634	1157	1326*	1543	1618	1672	1719	–
		+25 °С	0	0	0	2	39	47	53	60	61	63	63	69	–
	СРБ	+10→+25 °С	0	0	0	0	21	40	58	75*	87	94	96	104	–
		+25 °С	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	–
4ф	аэробы	+10→+25 °С	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	–
		+25 °С	40	152	251	292	356	393	416	463	478	485	490	499	–
	анаэро-бы	+10→+25 °С	0	4	34	91	147	182	204	554*	688	745	808	832	–
		+25 °С	0	0	21	23	24	26	28	34	45	48	49	50	–
	СРБ	+10→+25 °С	0	0	13	25	81	121	129	177*	200	208	217	220	–
		+25 °С	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	–
			0	0	0	0	0	0	1	3*	3	3	3	–	

Примечание: * – первое из значений после изменения температурного режима.

Для обозначения коэффициента температурной адаптации предлагается использовать символ tA_d , где t – фактическая температура в точке отбора пробы; d – время регистрации результата в сутках (начального или n -го). То есть:

$${}^{10}A_5 = \frac{N_{10} \times 100}{N_{25}},$$

где N_{10} и N_{25} – количество колоний гетеротрофов, выросших за 5 суток при культивировании посевов соответственно при +10 и +25 °С.

На станции 5, в отличие от четвертой, среда имела ярко выраженный окислительный характер (табл. 2). Культивирование посевов аэробов при +5 °С выявило достаточно низкий уровень активно растущих бактерий. Через 4–5 суток лишь одной из ста клеток удалось сформировать колонии. В то же время при +10 °С, что соответствует температуре в точке взятия пробы, рост отмечался уже на первые – вторые сутки, а их доля составляла 10–30 %. В дальнейшем, к двенадцатым суткам, во всех посевах низкотемпературного культивирования коэффициент температурной коррекции достиг этого уровня. Такие же тенденции наблюдались и для анаэробных бактерий.

Таблица 2

Изменение доли физиологически активных бактериальных клеток в зависимости от температуры и продолжительности инкубирования посевов (б. Круглая)

№ станции	Температура среды, °С	Еh, мВ	Органическое вещество, мг/г	Время учета, сутки	${}^m A_n$, %		
					аэробные		анаэробные
					5°	10°	10°
5ц	10,3	+95	429	начальное	0,6 (5)*	32,0 (2)*	2,9 (5)*
				7	4,0	21,0	17,0
				12	14,0	–	–
5ф	10,3	+111	243	начальное	1,0 (4)*	10,0 (1)*	1,0 (5)*
				7	5,9	30,0	7,0
				12	24,0	34,0	–
4ц	7,5	–200	412	начальное	–	1,0 (2)*	54,0 (5)*
				7	–	99,0	109,0
4ф	7,5	+180	317	начальное	–	2,6 (2)*	62,0 (3)*
				7	–	49,0	461,0

Примечание: * – в скобках указано время появления колоний при низкотемпературной инкубации посевов.

На станции 4 при четком разделении по окислительно-восстановительным условиям в восстановленных грунтах сульфуреты доля аэробных микроорганизмов, дающих рост при +10 °С, уже через семь суток достигла 99 %, тогда как в достаточно аэрированных фоновых грунтах степень активации составляла лишь 49 %. В то же время потенциальные ростовые возможности анаэробов оказались выше в фоновой точке. Изначально высокая их доля к седьмым суткам культивирования достигла рекордных 461 %. Среди анаэробных и, особенно, сульфатредуцирующих бактерий преобладали психрофильные формы (см. табл. 1). Возможно, это связано с тем, что пробы были отобраны в начале марта, когда бактериальное сообщество полностью адаптировалось к условиям пониженных температур, достигших в придонном слое +7,5 °С.

В хронически холодных антарктических водах мезофильные формы, не являясь типичными для таких условий, обычно привнесены извне либо человеком, либо животными (табл. 3). Это видно, в том числе, и по коэффициенту температурной адаптации. Если для точек с эпизодическим и постоянным хозяйственно-бытовым сбросом он оказался весьма низким (${}^4A_6 = 1,0$ и ${}^4A_4 = 0,3$ соответственно), то на фоновой точке достиг ${}^4A_9 = 4,0$. К концу же эксперимента, на 13-е сутки, коэффициент в чистой зоне

возрос до 30,7, то есть активной оказалась каждая третья бактериальная клетка, в то время как в двух других точках его значения составили лишь 6,1 и 3,0.

Таблица 3

Посуточное изменение числа колоний (КОЕ/мл) гетеротрофных бактерий в пробах из зон с различной степенью загрязнения (район о. Галиндез, Антарктика)

Уровень загрязнения	Температурный режим	Время, сутки											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13
Чистая зона	+21 °С	0	10	40	65	68	73	73	73	75	75	75	75
	+4 °С	0	0	0	0	0	0	0	0	3	5	15	23
Эпизодическое (органика) загрязнение	+21 °С	13	43	143	578	1565	1740	2098	2228	2293	2313	2313	2313
	+4 °С	0	0	0	0	0	18	38	63	78	100	120	140
Постоянный хозяйственной с/брос	+21 °С	0	63	273	1650	2833	3123	3295	3348	3353	3368	3368	3368
	+4 °С	0	0	0	5	9	25	35	40	50	64	84	101

Параллельными посевами на питательный агар (МПА) и среду Вильсона – Блера проверена возможность применения последней не только для выявления анаэробов и сульфатредукторов, но и для учета аэробных гетеротрофов. Число выросших на среде Вильсона – Блера колоний зачастую в 1,5–2,0 (и более) раза превышало их количество на МПА (табл. 4).

Таблица 4

Сопоставление ростовых возможностей питательного агара и среды Вильсона – Блера при учете численности гетеротрофных бактерий

Среда	Станции								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Мясопептонный агар	207	1125	11	3,3	19	579	1289	377	156
Среда Вильсона – Блера	482	394	29	3,8	39	839	1222	757	796

Учет отмеченных выше трех групп бактерий можно с успехом осуществлять на среде Вильсона – Блера. Ее отличие от питательного агара заключается в двух компонентах. Во-первых, это железосульфитный комплекс для выявления продуцирования H_2S , во-вторых, наличие глюкозы. С учетом степени разведения (1 : 10) сухого концентрата и типичности этих соединений для морских экосистем можно говорить скорее о стимуляции, а не об ингибировании роста аэробных бактерий.

Выводы

Введение коррекции численности микроорганизмов в зависимости от температурных условий места обитания позволяет более точно оценивать темпы самоочищения природных водоемов. Культивирование посевов при нехарактерных для холодного времени года температурах (+20...+25 °С) приводит, как правило, к ее завышению. Если в теплый период численность потенциально жизнеспособной и физиологически активной микрофлоры совпадает, то в условиях пониженных температур активной может оказаться лишь каждая сотая клетка.

Применение модифицированной среды Вильсона – Блера для выявления, наряду с анаэробными бактериями, также и аэробных, позволяет без снижения качества исследований сократить трудозатраты на их проведение.

Библиографические ссылки

1. **Горбенко Ю. А.** О наиболее благоприятном количестве «сухого питательного агара» в средах для культивирования морских гетеротрофных микроорганизмов // Микробиология. – 1961. – Т. 30, вып. 1. – С. 168–172.
2. **Жизнь** микробов в экстремальных условиях / Под ред. Д. Кашнера. – М. : Мир, 1981. – 519 с.
3. **Никифорова Е. П.** Численность сапрофитных бактерий в воде Рыбинского и Шекснинского водохранилищ при посевах на питательной среде различного состава / Е. П. Никифорова, В. И. Романенко // Биология внутренних вод. – 1972. – № 15. – С. 5–9.
4. **Родина А. Г.** Методы водной микробиологии. – Л. : Наука, 1965. – 363 с.
5. **Романенко В. И.** Микробиологические процессы продукции и деструкции органического вещества во внутренних водоемах. – Л. : Наука, 1985. – 295 с.
6. **Сомов Г. П.** Психрофильность патогенных бактерий / Г. П. Сомов, Т. Н. Варвашевич, Н. Ф. Тимченко. – Новосибирск : Наука, 1991. – 204 с.
7. **Юдин И. П.** Современные подходы к оценке жизнеспособности бактерий с акцентом на феномене некультурабельности // Annals of Mechnikov Institute. – 2007. – № 3. – С. 8–16.
8. **Bott T. L.** Bacterial growth rates and temperature optima in a stream with a fluctuating thermal regime // Limnol. Oceanogr. – 1975. – Vol. 20. – P. 191–197.
9. **Colwell R. R.** Bacterial death revisited // Nonculturable microorganisms in the environment / Ed. D. J. Grimes. – Washington, D. C. : ASM Press, 2000. – P. 325–342.
10. **Entry** into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment / J. Oliver, F. Hite, D. McDougald et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – Vol. 61. – P. 2624–2630.
11. **Isaksen M. F.** Adaptation of psychrophilic and psychrotrophic sulfate-reducing bacteria to permanently cold marine environments / M. F. Isaksen, B. B. Juergensen // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – Vol. 62. – P. 408–414.
12. **Rollins D.** Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment / D. Rollins, R. Colwell // Appl. Environ. Microbiol. – 1986. – Vol. 52. – P. 531–538.

Надійшла до редколегії 26.04.2012