

Ю.М. Юмина, Ж.П. Коптева, І.П. Козлова

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна

ДИНАМІКА МІКРОБНИХ ПОПУЛЯЦІЙ У БІОПЛІВЦІ НА ЗАХИСНОМУ ПОКРИТТІ

*Вивчено динаміку мікробних популяцій у біоплівці на поверхні захисного покриття Полікен 980-25. Показано, що в процесі сукцесії відбуваються зміни таксономічного складу бактерій біоплівки. На ранніх етапах сукцесії виявлялись бактерії роду *Pseudomonas*, які відновлюють Fe^{+3} і окиснюють вуглеводні. Після 2-х годин експозиції в біоплівці починають розвиватися бактерії роду *Arthrobacter*, через 6 годин після постановки досліду – бактерії роду *Bacillus*. Необхідно відмітити, що залізовідновлювальні бактерії як домінянти в біоплівці є агентами біопошкодження не тільки захисного матеріалу, але й металу.*

Ключові слова: біоплівка, біопошкодження, захисні покриття, бактерії-деструктори, сукцесія мікробних популяцій.

Біопошкодження захисних покриттів, які застосовуються для антикорозійної ізоляції підземних споруд, є результатом взаємодії бактерій-деструкторів і матеріалу, що руйнується. Необхідною умовою перебігу цього процесу є тісний контакт мікроорганізмів із поверхнею матеріалу, що здійснюється в біоплівці. Розвиток біоплівкових сукупностей бактерій – одна із головних стратегій виживання бактерій у середовищі.

Біоплівки, що формуються на захисних стрічкових і мастичних покриттях, складаються з гетеротрофного блоку аеробних і анаеробних бактерій: вуглеводнеокиснювальних, залізовідновлювальних, денітрифікувальних та сульфатвідновлювальних бактерій. Основні таксономічні групи представлені бактеріями родів: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Desulfovibrio* і *Streptomyces* [2,3].

У ґрунті постійно відбувається закономірна зміна (сукцесія) мікроорганізмів, яка триває протягом днів, тижнів та місяців [5]. Із метою виявлення часових змін у структурі бактеріальних сукупностей використовують метод сукцесійного аналізу, який дозволяє значно підвищити ступінь обліку бактеріальної різноманітності [4]. Сигналом до початку сукцесії можуть бути окремі фактори або їх комплекс, а саме: зволоження сухого ґрунту, настання сприятливого температурного режиму або його погіршення, органічні речовини тощо [1].

© Ю.М. Юмина, Ж.П. Коптева, І.П. Козлова, 2009

Під час вивчення мікрофлори пошкоджених залізобетонних конструкцій нами було виявлено, що накопичення сірчаної кислоти і зниження величини рН на поверхні бетону від 4 до 1 приводить до зміни популяцій тіонових бактерій *Thiobacillus thioparus* на *T. ferrooxidans*, який зустрічається в асоціації частіше з *T. thiooxidans*. Ці два мікроорганізми є найнебезпечнішими збудниками аеробної корозії залізобетону, яка призводить до руйнування каналізаційних систем [7].

У літературі відсутні відомості щодо закономірної зміни бактерій-деструкторів у біоплівці, що формується на поверхні захисних покриттів. Метою нашої роботи було вивчення sukcesії мікробних популяцій у системі покриття–мікроорганізми–середовище, тобто в біоплівці.

Матеріали і методи. Сукцесійний аналіз мікробних популяцій у біоплівці на поверхні захисного покриття Полікен 980-25 проводили за умов лабораторного експерименту. Об'єктами досліджень слугували бактерії-деструктори покриттів *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas* sp. 8, *Arthrobacter* sp. 102 та *Bacillus* sp. 138 і 140. Бактерії були нами раніше виділені з пошкоджених покриттів, що застосовуються для захисту газопроводів від корозії [2].

Досліди проводили у флаконах об'ємом 50 мл, в які заливали 30 мл рідкого середовища Таусона з глюкозою (20 г/л), вносили по 1 мл (10^6 клітин) суспензії асоціації вищезазначених бактерій і занурювали зразки покриття Полікен 980-25 розміром 12×20 мм (по одному зразку у флакон). Повторення дослідів – трьохкратне.

Облік бактерій біоплівки проводили на 1, 2, 3, 6, 9, 14, 24, 72, 168 і 336 годину. Після закінчення експерименту біоплівку десорбували з поверхні покриття на ультразвуковому диспергаторі УЗДН-2Т (частотою 22кГц) протягом 30 с (два рази з інтервалом 2 хв) у фіксований об'єм фізіологічного розчину.

Кількість бактерій визначали методом висіву з розведень на тверді поживні середовища і виражали у КУО (колоніютворюючих одиницях) на 1 см² поверхні зразка покриття.

Крім того, після зняття біоплівки з поверхні покриття за допомогою ультразвукового диспергатора, робили репліки (відбитки) з поліетиленового та бутилкаучукового шару дослідних зразків на селективні середовища для виявлення бактерій відповідної фізіологічної групи. Для виявлення залізовідновлювальних бактерій використовували середовище Каліненко, вуглеводнеокиснювальних – середовище Таусона, бактерій роду *Bacillus* – середовище Громико [9].

Результати та їх обговорення. Ми вивчали sukcesію мікробних популяцій у системі покриття–бактерії і реєстрували кількість і динаміку популяцій бактерій у біоплівці, що формувалась на поверхні покриття Полікен 980-25.

У процесі sukcesії спостерігали зміни в таксономічному складі бактерій, які висівали на селективні середовища Каліненко, Таусона та Громико. На ранніх етапах sukcesії домінували залізовідновлювальні та вуглеводнеокиснювальні бактерії роду *Pseudomonas*, які відновлювали Fe⁺³ і окиснювали вуглеводні. Після двох годин експозиції в біоплівці починають розвиватися бактерії роду *Arthrobacter*, які також здатні відновлювати трьохвалентне залізо, нітрати і окиснювати вуглеводні. Через 6 год після постановки дослідів починають розвиватися спороутворюючі бактерії роду *Bacillus*. За експозиції від 24 год і до кінця експерименту вони займають домінуюче положення у структурі бактеріального комплексу біоплівки (рис. 1).

З даних літератури відомо, що коли число факторів, що визначають структуру системи, небагато, тобто система “молода”, то в ній переважають r-стратегі – мікроорганізми з високою швидкістю росту, які мають більше можливості вижити на ранніх стадіях колонізації субстратів за рахунок високої продуктивності. До таких мікроорганізмів належать бактерії роду *Pseudomonas*. У процесі sukcesії середовище внаслідок розвитку бактерій стає більш різномірним і збільшується кількість K-стратегів – мікроорганізмів, що ростуть повільно і мають підвищену конкурентну здатність [6].

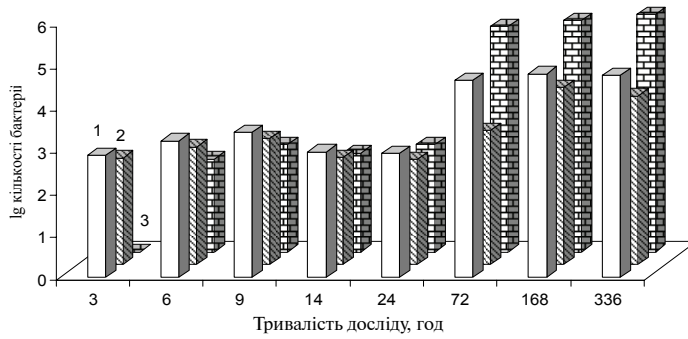
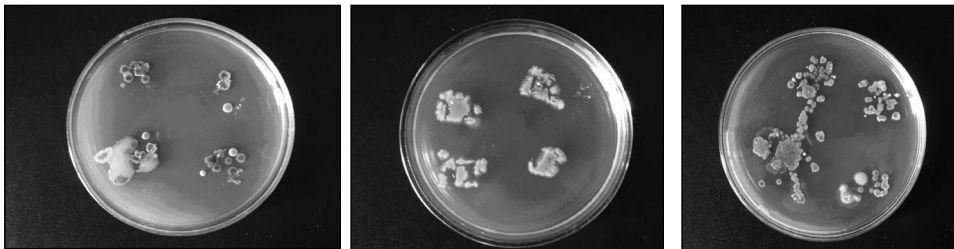


Рис. 1. Динаміка кількості бактерій у біоплівці на поверхні покриття Полікен 980-25 (КУО/см²)

1 – залізовідновлювальні; 2 – вуглеводнеокиснювальні; 3 – бактерії роду *Bacillus*

Методом реплік на селективних середовищах виявлено колонії залізовідновлювальних і вуглеводнеокиснювальних бактерій (рис. 2). Вже за годину після постановки досліді на поверхні покриття починають утворюватись колонії бактерій, що виявилось при використанні метода реплік на відповідному середовищі. На рис. 2(I) і 2(II) видно, що на поверхні покриття Полікен 980-25 адгезувалась і створила колонії різна кількість бактерій. Тобто метод реплік опосередковано підтверджує, що на твердій поверхні покриття відбувається інтенсивне формування біоплівки.

I



а

б

в

II



а

б

Рис. 2. Бактерії на селективних середовищах, які виділені з поверхні покриття Полікен 980-25 методом реплік:

I – Залізовідновлювальні бактерії: а – експозиція 5 год,

б – експозиція 6 год, в – експозиція 24 год;

II – Вуглеводнеокиснювальні бактерії: а – експозиція 2 год, б – експозиція 3 год

Цікаво відмітити, що на липкому шарі покриття, який має бутилкаучук, число бактерій було в 5–10 разів більше, ніж на поверхні поліетилену. Нами раніше було показано, що під впливом денітрифікувальних і сульфатвідновлювальних бактерій значно знижувались міцнісні характеристики полімерних покриттів [3]. На зразках покриття Полікен 980-25 після дії бактерій спостерігали пошкодження клейової основи. Наприклад, сукупність цих бактерій знижувала адгезійну міцність покриття на 60 % відносно контролю. У варіанті досліду, де матеріал використовували як джерело вуглецю, повністю утилізувався бутилкаучуковий шар покриття. У разі пошкодження клейового шару захисного покриття бактерії порушують адгезію до металу, що, в свою чергу, сприяє його корозії.

Отже, в біоплівці на покритті протягом 14 діб (336 год) спостерігали зміну домінантів. У мікробній сукупності переважали бактерії, які утворюють слиз. Відомо, що здатність до слизоутворення притаманна багатьом видам ґрунтових мікроорганізмів. Слизи здебільшого є полісахаридами, які можуть містити уронові кислоти. Карбоксильні групи в їх складі зумовлюють деструкцію ізоляційних матеріалів. Відомо, що біоплівка як сукупність бактерій та продуктів їх метаболізму формується на поверхні покриття. Мікроорганізми, що утворюють біоплівку, мають високу метаболічну активність і здатні пошкоджувати різні за хімічним складом захисні покриття.

Таким чином, у динаміці в умовах лабораторного експерименту вивчено структуру бактеріальної сукупності на поверхні покриття Полікен 980-25. Показано, що залізо-відновлювальні та вуглеводнеокиснювальні бактерії роду *Pseudomonas* є домінантами на ранніх етапах сукцесії. Пізніше в біоплівці переважають бактерії роду *Bacillus*, які стійкіші до несприятливих факторів навколишнього середовища. Досліджені нами мікроорганізми під час росту та розвитку здатні виділяти екзополімерні сполуки, зокрема полісахариди, ліпополісахариди, ферменти та інші сполуки [3, 8, 10]. У процесі окислення, відновлення й інших реакцій мікроорганізми за допомогою ферментів руйнують низькомолекулярні фракції ізоляційних матеріалів. У цьому випадку змінюються експлуатаційні властивості покриттів, що спричиняє їх руйнування.

Ю.М. Юмина, Ж.П. Коптева, И.А. Козлова

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

ДИНАМИКА МИКРОБНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ В БИОПЛЕНКЕ НА ЗАЩИТНОМ ПОКРЫТИИ

Резюме

Изучена динамика микробных популяций в биопленке на поверхности защитного покрытия Поликен 980-25. Показано, что в процессе сукцессии происходят изменения таксономического состава бактерий биопленки. На ранних этапах сукцессии выявлялись бактерии рода *Pseudomonas*, восстанавливающие Fe^{+3} и окисляющие углеводороды. После 2-х часов экспозиции в биопленке начинают развиваться бактерии рода *Arthrobacter*, через 6 часов после постановки опыта – бактерии рода *Bacillus*. Необходимо отметить, что железовосстанавливающие бактерии, как доминанты в биопленке, являются агентами биоповреждения не только защитного материала, но и металла.

Ключевые слова: биопленка, биоповреждения, защитные покрытия, бактерии-деструкторы, сукцессия микробных популяций.

Yu. M. Yumina, Zh. P. Kopteva, I. P. Kozlova

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

DYNAMICS OF MICROBIAL POPULATIONS IN THE BIOFILM ON PROTECTIVE COATING

Summary

Dynamics of microbial populations in the biofilm on the surface of protective coating Poliken 980-25 has been studied. It was shown that in the process of succession one can observe some changes of taxonomic composition of biofilm bacteria. Bacteria of *Pseudomonas* genus were revealed at early stages of succession,

they reduce Fe^{+3} and oxidize carbohydrates. Bacteria of *Arthrobacter* genus begin developing 2 hours after the exposure, *Bacillus* genus bacteria appear 6 hours after the experiment beginning. It should be noted that iron-renewing bacteria as dominants in the biofilm are the agents of biolesion of not only protective material but also metal.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у о р д с: biofilm, biodeterioration, protective coatings, bacteria-destructors, succession of microbial association.

Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s: Yu. M. Yumina, Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Андреев Е.И., Валагурова Е.В. Основы экологии почвенных микроорганизмов. — Киев: Наук. думка, 1992. — 224 с.
2. Андреев Е.И., Коптева Ж.П. Микробное повреждение изоляционных покрытий газопроводов // Микробиол. журн. — 1987. — 44, № 2. — С. 46–49.
3. Андреев К.И., Козлова И.П., Коптева Ж.П., Пиляшенко-Новохатный А.И., Занина В.В., Пуриш Л.М. Микробна корозія підземних споруд. — Київ: Наук. думка, 2005. — 260 с.
4. Добровольская Т.Г. Структура бактериальных сообществ. — Москва: ИКЦ Академкнига, 2002. — 282 с.
5. Зягинцев Д.Г., Кириллова Н.П., Кочкина Г.А., Полянская Л.М. Методы изучения микробных сукцессий в почве // Микроорганизмы как компонент биогеоценоза. — Москва: Наука, 1984. — С. 31–54.
6. Кожевин П.А. Микробные популяции в природе. — Москва: Издат. МГУ, 1989. — 179 с.
7. Коптева Ж.П., Занина В.В., Пуриш Л.М., Пиляшенко-Новохатный А.И., Козлова И.А. Микрофлора поврежденных железобетонных конструкций в условиях ингибиторной защиты // Микробиол. журн. — 2004. — 66, № 5. — С. 68–75.
8. Коптева Ж., Занина В., Пиляшенко-Новохатный А., Коптева Г. Экзополимеры бактерий-деструкторов захисних покриттів // Фіз.-хім. механіка матеріалів. — 2004. — Спец. вип. № 4. — С. 725–729.
9. Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов. — Ленинград: Наука, 1974. — 193 с.
10. Beveridge T.J., Makin S.A., Kadurugamuwa J.L., Zusheng Li. Interactions between biofilms and the environment // Fems microbiology reviews. — 1997. — 20, N 3–4. — P. 291–304.

Отримано 15.07.2008