

Н. В. ТКАЧУК¹, П. Д. МАЗУР¹, Л. Б. ЗЕЛЕНА²

**БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ ШТАММОВ
*DESULFOVIBRIO ORYZAE***

¹Национальный университет «Черниговский колледж» имени
Т.Г.Шевченко, г. Чернигов, Украина

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН
Украины, г. Киев, Украина

natalia.smykun@gmail.com, MazurP@i.ua, zelenalyubov@hotmail.com

*Исследована интенсивность биопленкообразования штаммами *Desulfovibrio oryzae* и *Anaerotignum propionicum*, выделенными из ферросферы почвы, по окрашиванию сформированных биопленок кристаллическим фиолетовым. Показано формирование более мощной биопленки штаммом NChC SRB1. Для ассоциаций *D. oryzae* с *A. propionicum* NChC Sat 1 отмечено неоднозначность интенсивности биопленкообразования.*

*Ключевые слова: биопленка, *Desulfovibrio oryzae*, *Anaerotignum propionicum*.*

Биопленки являются структурированными микробными сообществами, окруженными биополимерным матриксом. Они образуются вследствие адгезии микроорганизмов к биотическому или абиотическому субстрату. Существование бактерий в биопленке обеспечивает им значительные преимущества по сравнению с изолированными клетками. В частности бактерии в биопленках характеризуются повышенной стойкостью к действию агрессивных веществ, факторам иммунной защиты и антимикробным препаратам. Способность микроорганизмов формировать биопленки активно используется в биотехнологии [1,2,3,4,5]. Однако образование биопленок на поверхностях строительных материалов, трубопроводов и других конструкциях способствует их повреждению. Сам процесс микробно индуцированной коррозии определяется как следствие деятельности микроорганизмов в форме биопленки на металлической или иной поверхности, что корродирует. Зоной активного развития коррозионно опасных микроорганизмов почвы, непосредственно контактирующей с поверхностью металла подземной конструкции, является ферросфера

[6]. Ранее из сульфидогенного микробного сообщества, изолированного из ферросферы почвы, выделены штаммы сульфатвосстанавливающих бактерий *Desulfovibrio oryzae* NUChC SRB1 и NUChC SRB2, а также штамм органические кислоты-продуцирующих бактерий *Anaerotignum propionicum* NUChC Sat1, биопленкообразование которых не исследовано, что и было целью данной работы.

В исследовании использовали 5-суточные чистые культуры *Anaerotignum propionicum* NUChC Sat1, *Desulfovibrio oryzae* NUChC SRB1 и *Desulfovibrio oryzae* NUChC SRB2, выделенные из сульфидогенного микробного сообщества ферросферы почвы [7,8]. Номера в GenBank, соответственно, MG924854.1, MT102713.1 и MT102714.1. Использовали как монокультуры бактерий, так и их ассоциации (NUChC SRB1 + NUChC Sat1; NUChC SRB2 + NUChC Sat1). Бактерии культивировали в жидкой среде Постгейта «С» в анаэробных условиях, полностью заполняя пробирки средой и закрывая их резиновыми пробками.

Интенсивность биопленкообразования штаммами исследовали по поглощению кристаллического фиолетового сформированными биопленками согласно методике, представленной в работе Лагун и соавторы [9], с некоторыми модификациями. При этом из культур исследуемых штаммов в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида готовили суспензии с оптической плотностью 0,5 МакФарланд. При исследовании биопленкообразования монокультурами бактерий рассчитанная начальная концентрация бактериальных клеток в среде Постгейта «С» составляла $1 \cdot 10^7$ клеток/мл (NUChC SRB1 и NUChC SRB2) и $1 \cdot 10^3$ клеток/мл (NUChC Sat1). При исследовании образования биопленок бактериальными ассоциациями (NUChC SRB1 + NUChC Sat1, NUChC SRB2 + NUChC Sat1) рассчитанная общая начальная концентрация бактерий в среде составляла $2 \cdot 10^7$ клеток/мл. Посевы инкубировали в термостате (статичные условия) при 29 °С в течение 6-ти и 14-ти суток. Окрашивание сформированных биопленок проводили 0,1 %-ным водным раствором кристаллического фиолетового при 30 °С в течение 60 мин. Измерение концентрации кристаллического фиолетового в контрольных и опытных образцах проводили при длине волны 540 нм на фотоэлектроколориметре КФК-2-УХЛ 4.2 в кювете с длиной оптического пути 1,0 мм. Для количественной оценки толщины сформированных биопленок использовали концентрации кристаллического фиолетового в отмывочных спиртовых растворах и массу красителя, сорбированного биопленкой. Считали, что биомасса сформированных биопленок прямо

пропорциональна концентрации кристаллического фиолетового в отмывочных растворах, массу биопленки представляли как массу красителя, поглощенного биопленкой при окрашивании.

Для статистической обработки полученных результатов использовали статистический модуль программы Microsoft Office Excel 2010. Применяли методы описательной статистики – рассчитывали среднее арифметическое значение (M) и стандартную ошибку среднего арифметического значения (m) [10]. Рассчитывали критерий значимости Стьюдента (t), статистически значимой считали 95 %-ную вероятность отличий ($p < 0,05$).

Результаты количественного определения интенсивности биопленкообразования штаммов *D. oryzae* и *A. propionicum* представлены в [таблице 1](#).

Таблица 1 – Интенсивность биопленкообразования исследуемых штаммов

№ п/п	Вариант опыта	Краситель, поглощенный биопленкой, мг/л	
		6-е сутки	14-е сутки
1.	Контроль (среда Постгейта «С» без бактерий)	1,45±0,03	1,63±0,04
2.	SRB1	14,53±0,07*	14,27±0,14*
3.	SRB2	6,57±0,07*	10,95±0,77*
4.	Sat 1	2,45±0,03*	2,24±0,11*
5.	SRB1 + Sat 1	9,80±0,01* **	13,00±1,43*
6.	SRB2 + Sat 1	11,70±0,02* ***	10,86±0,38*

Примечание: отличия достоверны при $p \leq 0,05$ ($t_{st} = 2,92-2,30-6,97$):
 * по сравнению с контролем,
 ** по сравнению с вариантом 2,
 *** по сравнению с вариантом 3.

Установлено, что исследуемые штаммы сульфатвосстанавливающих бактерий способны к образованию биопленки и относятся к сильноадгезивным [11]. При этом отмечено, что штамм NUChC SRB1 достоверно формировал более мощную биопленку, чем штамм NUChC SRB2, как на 6-е, так и на 14-е сутки эксперимента - в 2,2 раза и в 1,3 раза соответственно. Следует отметить, что штамм органические кислоты-продуцирующих бактерий *A. propionicum* NUChC Sat 1 в монокультуре слабо формировал биопленку как на 6-е, так и на 14-е сутки культивирования, возможно, из-за неблагоприятной для его роста и развития питательной среды. Однако при совместном культивировании сульфатвосстанавливающих бактерий *D. oryzae* с *A. propionicum* NUChC

Sat 1 отмечено достоверные изменения в интенсивности биопленкообразования на 6-е сутки эксперимента. Так, в случае культивирования ассоциации SRB1 с Sat 1 биомасса сформированной биопленки оказалась достоверно меньше (в 1,5 раза), чем при культивировании одного штамма SRB1. При совместном культивировании SRB2 с Sat 1 масса сформированной биопленки оказалась достоверно больше (в 1,8 раза), чем в монокультуре SRB2. На 14-е сутки культивирования интенсивность биопленкообразования ассоциаций SRB1 и SRB2 с *A. propionicum* не отличалась от таковой в монокультурах сульфатвосстанавливающих бактерий.

Таким образом, штаммы *D. oryzae* NUChC SRB1 и NUChC SRB2 относятся к высокоадгезивным. Штамм *D. oryzae* NUChC SRB1 формировал более мощную биопленку, чем штамм *D. oryzae* NUChC SRB2. При совместном культивировании *D. oryzae* с *A. propionicum* NUChC Sat 1 интенсивность биопленкообразования неоднозначна.

Список литературы

1 Ерошенко, Д.В. Влияние факторов внешней среды на первые этапы образования биопленок бактериями *Staphylococcus epidermidis*: дис. ... канд. биол. наук / Д. В. Ерошенко. – Пермь, 2015. - 137 с.

2 Сироткин, А. С. Агрегация микроорганизмов: флоккулы, биопленки, микробные гранулы / А. С. Сироткин, Г. И. Шагинурова, К. Г. Ипполитов. – Казань: Издательство «Фэн» АН РТ, 2007. – 160 с.

3 Gross, R. Microbial biofilms: new catalysts for maximizing productivity of long-term biotransformations / R. Gross, B. Hauer, K. Otto, A. Schmid // *Biotechnol Bioeng.*, 2007. – Vol. 98, № 6. – P. 1123–1134.

4 Rosche, B. Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis? / B. Rosche, X.Z. Li, B. Hauer, A. Schmid, K. Buehler // *Trends Biotechnol.*, 2009. – Vol. 27, № 11. – P. 636–643.

5 Halan, B. Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses / B. Halan, K. Buehler, A. Schmid // *Trends Biotechnol.*, 2012. – Vol. 30(9). – P. 453–465.

6 Мікробна корозія підземних споруд / К. І. Андреюк [та ін.]. – Київ: Наукова думка, 2005. – 258 с.

7 Ткачук, Н. Виділення та ідентифікація анаеробного супутника сульфатвідновлювальних бактерій / Ткачук Н., Зелена Л., Гаркавенко К. // «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки/BioScience Advances»: збірник тез XVI Міжнародної наукової конференції студентів та молодих

вчених (м. Київ, 24-27 квітня 2018 р.). – Київ: Паливода А.В., 2018. – С.106-107.

8 Ткачук, Н.В. Виділення сульфатвідновлювальних бактерій із сульфідогенного бактеріального угруповання феросфери ґрунту / Н.В. Ткачук, М.В. Степко, Л.Б. Зелена // V Міжнародна заочна науково-практична конференція «Актуальні питання біологічної науки» (16 квітня 2019 р., м. Ніжин): Збірник статей. – Ніжин: НДУ імені Миколи Гоголя, 2019. – С. 148-150.

9 Лагун, Л.В. Интенсивность образования микробных биопленок микроорганизмами, выделенными при пиелонефрите и мочекаменной болезни / Л.В. Лагун, Д.В. Тапальский, С.В. Жаворонок // Медицинский журнал. – 2012. – № 4. – С. 64-67.

10 Плохинский, Н.А. Биометрия / Н.А. Плохинский. – Москва: Изд-во Московского ун-та, 1970. – 368 с.

11 Stepanović, S. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation / S. Stepanović, D. Vuković, I. Dakić, B. Savić, M. Švabić-Vlahović // Journal of Microbiological Methods, 2000. – No 40. – P. 175-179.