

Г.Г.Павлова

Одеський філіал Інституту біології південних морів НАН України, м.Одеса

**ПОШИРЕННЯ ФОСФАТРОЗЧИНЮЮЧИХ БАКТЕРІЙ
У ВОДІ ТА ДОННИХ ВІДКЛАДЕННЯХ
ПІВНІЧНО-ЗАХІДНОЇ ЧАСТИНИ ЧОРНОГО МОРЯ**

Оптимізовано склад живильного середовища для виявлення морських фосфатрозчинюючих бактерій (ФРБ). Виявлено позитивну кореляцію між кількістю гетеротрофних бактерій та фосфатрозчинюючих бактерій. Чисельність ФРБ у досліджених зразках води та донних відкладень має сезонний характер. Найбільша відносна їх кількість виявлена у донних відкладеннях.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: *фосфат розчинюючі бактерії, донні відкладення, північно-західна частина Чорного моря, поширення.*

Доступність розчиненого неорганічного фосфату лімітує первинну біологічну продуктивність у більшості прісних і морських екосистем, де розчинені органічні фосфоровмісні сполуки можуть ставати головними джерелами фосфору [1 – 5]. Фосфор є одним з головних регуляторів всіх інших біогеохімічних циклів [6].

Геохімічний колообіг фосфору повністю незамкнутий. Це пов'язано з тим, що він не утворює летких сполук і погано розчиняється у воді. У біосфері здійснюється односпрямований потік фосфору з гірських порід суші в глибини океану, і обмінний фонд його в гідросфері дуже обмежений [5]. Колообіг фосфору у водних середовищах забезпечується завдяки діяльності біоти [7]. При цьому важливу роль відіграють мікроорганізми, що здатні мобілізувати цей елемент з неорганічних і органічних сполук фосфору, трансформуючи його у органічні сполуки або акумулюючи у вигляді поліфосфатів [8 – 16]. За участю фосфатрозчинюючих бактерій здійснюється перехід нерозчинних форм фосфату у розчинні форми, які є більш доступними для споживання організмами.

Колообіг фосфору має величезне значення у формуванні біоценозів. Незважаючи на всю важливість питання, воно до цього часу досліджено недостатньо і вимагає подальшого вивчення.

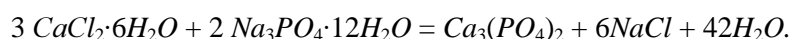
Метою роботи було дослідження поширення фосфатрозчинюючих бактерій у воді та донних відкладеннях північно-західної частини Чорного моря (ПЗЧМ).

Матеріал та методика. Робота виконувалась на базі мікробіологічної лабораторії Одеського філіалу Інституту біології південних морів (ОФ ІнБПМ). Дослідження проведено протягом 2008 р.

Предметом дослідження були фосфатрозчинюючі бактерії Одеського регіону ПЗЧМ та узмор'я Дунаю. Було досліджено 11 станцій з узмор'я Дунаю та 14 – з Одеського регіону по три проби з кожної станції – з двох горизонтів (поверхневий, 0,5 м, та придонний горизонт) та донних відкладень. Зразки були відібрані у ході експедицій, проведених ОФ ІнБПМ. В узмор'ї

Дунаю відбір проб проведений у періоди 3 – 6.06, 16 – 20.08 та 23 – 27.10. 2008 р., у Одеському регіоні ПЗЧМ 2 – 5.08 та 18 – 24.10. 2008 р. Всього оброблено 136 зразків.

Для виділення фосфатрозчинюючих бактерій був використаний чашковий метод, коли активні мікроорганізми відбираються з колоній на агаризованій пластинці в зонах розчинення фосфату. Виділення морських гетеротрофних розчинюючих фосфат бактерій з води та донних відкладень проводили на середовищі наступного складу: глюкоза – 10 г, аспарагін – 1 г, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ – 3,3 г, $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ – 3,8 г, агар-агар – 20 г, морська вода – 1 л (середовище підібрано автором експериментально). Для візуалізації ефекту кислотоутворення в склад середовища вводили індикатор зміни рН – бромтимоловий синій з концентрацією $0,24 \cdot 10^{-2}$ г·см⁻³ [17]. В якості джерела азоту в цьому середовищі використовується фізіологічно нейтральний аспарагін – одна з найбільш універсальних азотвмісних сполук для синтетичних середовищ. Джерелом вуглецю слугує глюкоза. Для утворення в поживному середовищі тяжкорозчинного фосфату кальцію використовувалась методика осадження Герретсена [18]. В стерильне расплавлене середовище вносили 3,3 г $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, а потім 3,8 г $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$. При такому послідовному внесенні фосфат натрію взаємодіє з хлористим кальцієм за реакцією:



На літр середовища приходить 1,5 г свіжоосадженого фосфату кальцію. При такому способі внесення нерозчинного фосфату кальцію середовище виходить рівномірно мутним, а зони розчинення – більш чіткими, що особливо важливо при підрахунку кількості фосфатрозчинюючих мікроорганізмів [19].

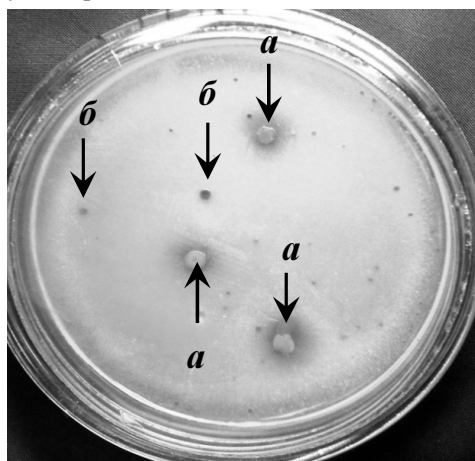
Чисельність гетеротрофних мікроорганізмів визначали за загальною кількістю колоній на чашці Петрі на тому ж середовищі.

Засіяні чашки інкубували 7 днів при температурі 28 °С.

Статистичну обробку отриманих даних проводили в пакетах комп'ютерних програм *MS Office – Microsoft Excel* та *Statistica 6*.

Результати та обговорення. На основі появи прозорих зон навколо колоній на щільному поживному середовищі з бромтимоловим синім було виявлено фосфатрозчинюючі бактерії (рис.1).

Узмор'я Дунаю. В поверхневому та придонному горизонтах води узмор'я Дунаю кількість гетеротрофних бактерій змінювалась від 565 до 28000 КУО·см⁻³, відносна кількість ФРБ (від кількості гетеротрофних бактерій) в червні складала 28,7 та



Р и с . 1 . Колонії бактерій на чашках Петрі з модифікованим середовищем, що містить фосфат кальцію: колонії з прозорими зонами розчинення неорганічного фосфату кальцію (а); колонії без зон (б).

Таблиця 1. Чисельність гетеротрофних та фосфатрозчинюючих бактерій в узмор'ї Дунаю ($r = 0,96$).

дата відбору проб	горизонт	чисельність гетеротрофних бактерій, КУО·см ⁻³ (г ⁻¹)	вміст фосфатрозчинюючих бактерій	
			КУО·см ⁻³ (г ⁻¹)	відсоток від загальної кількості гетеротрофних бактерій, %
3 – 6.06. 2008 р.	поверхневий	28000 ± 2575	8040 ± 120	28,7
	придонний	565 ± 157	87 ± 18	15,4
	відкладення	29170 ± 4510	12530 ± 1678	43,0
16 – 29.08 2008 р.	поверхневий	3000 ± 752	340 ± 73	11,3
	придонний	1400 ± 324	140 ± 35	10,0
	відкладення	4100 ± 917	650 ± 162	15,9
23 – 27.10 2008 р.	поверхневий	4980 ± 1065	465 ± 133	9,3
	придонний	3500 ± 715	873 ± 201	24,9
	відкладення	3030 ± 850	1250 ± 389	41,3

15,4 %, в серпні – 11,3 та 10 %, в жовтні – 9,3 та 24,9 % відповідно (табл.1). Зменшення відносної кількості ФРБ в узмор'ї Дунаю в серпні відмічено в поверхневому та придонному горизонтах води – відповідно в 2,5 та 1,5 рази в порівнянні з червнем, що можна пояснити суттєвим збільшенням обсягу поверхневого стоку з водозбірної площі, яке мало місце в кінці травня – на початку червня. В жовтні, на відміну від червня та серпня, процент ФРБ поступово збільшувався від поверхневого до придонного горизонту (рис.2).

В донних відкладеннях узмор'я Дунаю чисельність гетеротрофних бактерій змінювалась від 3030 до 29170 КУО·г⁻¹. Як влітку, так і восени, відносна кількість ФРБ коливалась у межах 15,9–43 % (від кількості гетеротрофних бактерій (рис. 2). Кількість ФРБ у ґрунті в серпні зменшилась у 2,7 рази у порівнянні з червнем. В жовтні цей показник наблизився до рівня червня і склав 41,3 %, вірогідно, це пов'язано з сезонними коливаннями обсягу річкового стоку Дунаю, що до якого надходять мінеральні добрива та теригенний матеріал, які є джерелом нерозчинних форм фосфату.

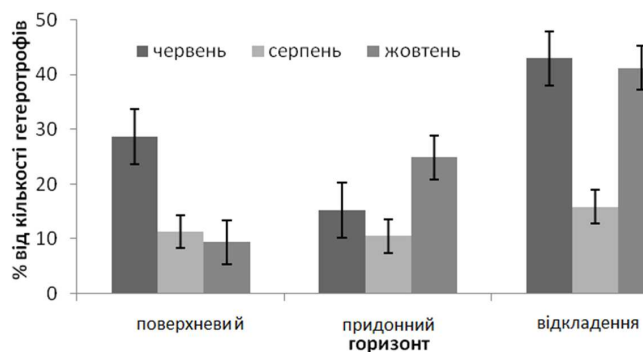


Рис. 2. Відносна кількість ФРБ в узмор'ї Дунаю.

Т а б л и ц я 2. Чисельність гетеротрофних та фосфатрозчинюючих бактерій в Одеському регіоні ПЗЧМ ($r = 0,96$).

дата відбору проб	горизонт	чисельність гетеротрофних бактерій, КУО·см ⁻³ (г ⁻¹)	вміст фосфатрозчинюючих бактерій	
			КУО·см ⁻³ (г ⁻¹)	відсоток від загальної кількості гетеротрофних бактерій, %
2 – 5.08 2008 р.	поверхневий	13200 ± 3804	90 ± 24	0,7
	придонний	4600 ± 2070	40 ± 12	0,9
	відкладення	575 ± 122	360 ± 83	62,6
18 – 24.10 2008 р.	поверхневий	6550 ± 1874	1065 ± 348	16,3
	придонний	600 ± 250	74 ± 24	12,3
	відкладення	1350 ± 340	570 ± 231	42,2

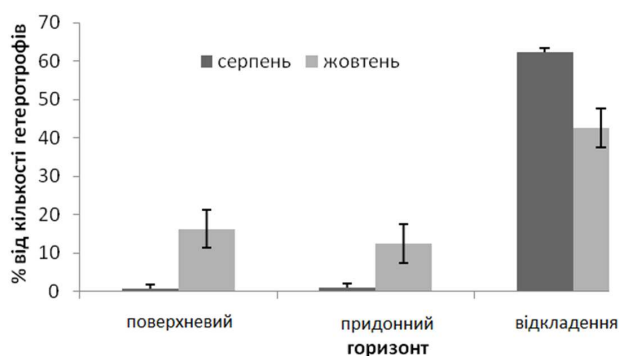
Одеський регіон ПЗЧМ. В поверхневому та придонному горизонтах води в Одеському регіоні кількість гетеротрофних бактерій змінювалась від 600 до 13200 КУО·см⁻³, відносна кількість ФРБ (від кількості гетеротрофних бактерій) в серпні складала 0,7 та 0,9 %, в жовтні – 16,3 та 12,3 % відповідно (табл.2).

Влітку в Одеському регіоні ПЗЧМ відносна кількість ФРБ в досліджуваних горизонтах води не перевищувала одного відсотка від кількості гетеротрофних бактерій (рис.3). В жовтні відносна кількість ФРБ в Одеському регіоні в поверхневому та в придонному горизонті збільшилась у 23 та 14 разів відповідно, що пов'язано з надходженням сезонних теригенних стоків.

Нами виявлено, що відсоток ФРБ поступово зменшується від поверхневого до придонного горизонту, збільшуючись у донних відкладеннях.

В донних відкладеннях Одеського регіону чисельність гетеротрофних бактерій змінювалась від 575 до 1350 КУО·г⁻¹, відносна кількість ФРБ (від кількості гетеротрофних бактерій) складала в серпні та жовтні 62,6 та 42,2 % відповідно (рис.3). Таким чином, найбільша відносна кількість ФРБ у Одеському регіоні ПЗЧМ виявлена у донних відкладеннях.

Виявлено позитивну кореляцію між загальною кількістю гетеротрофних бактерій та кількістю ФРБ, яка простежується в узмор'ї Дунаю в поверхневому та придонному горизонті та в донних відкладеннях у всі періоди дослі-



Р и с . 3 . Відносна кількість ФРБ в Одеському регіоні ПЗЧМ.

Т а б л и ц я 3. Рівень кореляційного зв'язку між кількістю гетеротрофних бактерій та ФРБ в узмор'ї Дунаю у періоди досліджень по горизонтам.

	поверхневий горизонт	придонний горизонт	донні відкладення
червень	0,98	0,99	0,99
серпень	0,92	0,47	0,98
жовтень	0,72	0,97	0,99

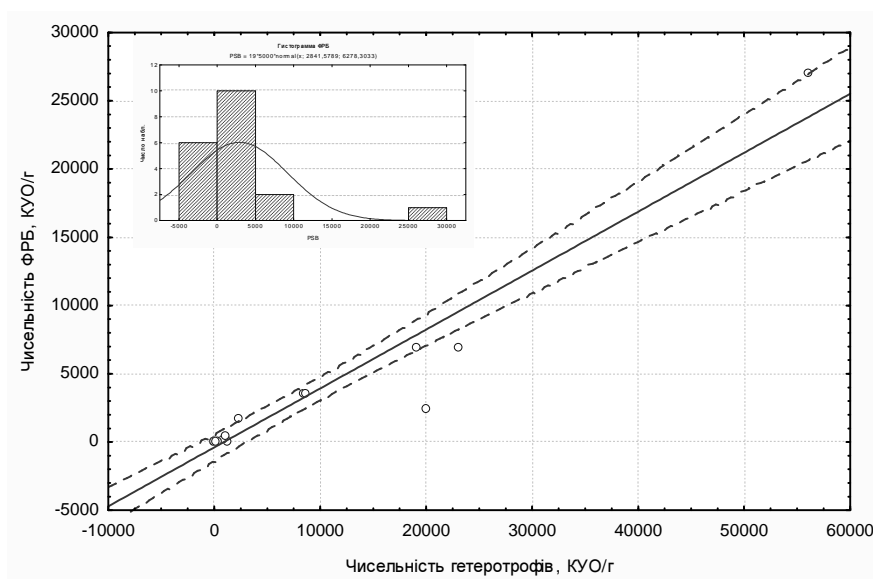
Т а б л и ц я 4. Рівень кореляційного зв'язку між кількістю гетеротрофних бактерій і ФРБ в Одеському регіоні ПЗЧМ у періоди досліджень по горизонтам.

	поверхневий горизонт	придонний горизонт	донні відкладення
серпень	0,48	- 0,5	0,68
жовтень	0,39	0,52	0,69

дження (табл.3, рис.4). В Одеському регіоні ПЗЧМ у серпні така залежність простежувалась лише в поверхневому горизонті, а у жовтні, навпаки, вона поступово збільшувалась від поверхневого горизонту до донних відкладень (спостерігався помірний зв'язок) (табл.4).

Розраховані нами значення кореляції перевірялись за критерієм Стьюдента. Приведені в таблицях дані мають рівень достовірності, який перевищує 95 %.

Процеси мінералізації органічних фосфатвмісних сполук та розчинення тяжкорозчинних неорганічних сполук фосфору за участю мікроорганізмів відображають різні сторони колообігу фосфору і сприяють вивільненню фосфатів із цих сполук, що веде до збільшення запасів розчинних форм фосфору.



Р и с . 4. Взаємозв'язок між чисельністю гетеротрофних бактерій та ФРБ в узмор'ї Дунаю в донних відкладеннях ($r = 0,9614$; $p = 0,05$; $y = -391,401872 + 0,431639629x$).

Таким чином, отримані нами результати вказують на наявність певної сезонної динаміки чисельності фосфатрозчинюючих бактерій, на розподілення цих бактерій по горизонтах та на здатність акумулюватися у донних відкладеннях, а також на прямий взаємозв'язок між чисельністю гетеротрофних та фосфатрозчинюючих бактерій.

Висновки. В результаті проведених експериментів нами:

1. Оптимізовано склад живильного середовища для виявлення морських фосфатрозчинюючих бактерій.

2. Встановлено, що середня чисельність фосфатрозчинюючих бактерій з узмор'я Дунаю та Одеського регіону північно-західної частини Чорного моря складала 2675 та 366,5 КУО·см⁻³ (г⁻¹) відповідно (22 % від загальної чисельності гетеротрофних бактерій). Найбільша відносна чисельність фосфатрозчинюючих бактерій виявлена в донних відкладеннях (15,9 – 62,6 %).

3. Встановлено позитивний кореляційний зв'язок між чисельністю гетеротрофних і фосфатрозчинюючих бактерій; мінливість чисельності фосфатрозчинюючих бактерій з максимумом восени.

Подальше вивчення фосфатмобілізації в північно-західній частині Чорного моря буде мати велике значення для розуміння ролі мікроорганізмів у колообігу фосфору в морських екосистемах.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Carpenter S.R.* Eutrophication of aquatic ecosystems: bistability and soil phosphorus // *PNAS.*– 2005.– v.102, № 29.– P.10002-10005.
2. *Clark L.L., Ingall E.D., Benner R.* Marine phosphorus is selectively remineralized // *Nature.*– 1998.– v.393.– P.426.
3. *Clark L.L., Ingall E.D., Benner R.* Marine organic phosphorus cycling: novel insights from nuclear magnetic resonance // *Am. J. Sci.*– 1999.– № 2999.– P.724-737.
4. *Kolowitz L.C., Ingall E.D., Benner R.* Composition and cycling of marine organic phosphorus // *Limnol. Oceanogr.*– 2001.– v.46.– P.309-320.
5. *Paytan A., McLaughlin K.* The oceanic phosphorus cycle // *Chem. Rev.*– 2007.– v.107.– P.563-576.
6. *Karl D.M.* Phosphorus, the staff of life // *Nature.*– 2000.– v.406.– P.31-32.
7. *Blake R.E., O'Neill J.R., Surkov A.V.* Biogeochemical cycling of phosphorus: insights from oxygen isotope effects of phosphoenzymes // *Am. J. Sci.*– 2005.– v.305.– P.596-620.
8. *Мишустина И.Е., Щеглова И.К., Мицкевич И.Н.* Морская микробиология.– Владивосток: Дальневосточный ун-т, 1985.– 184 с.
9. *Родина А.Г.* Методы водной микробиологии.– М.: Наука, 1965.– 361 с.
10. *Теплер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И.* Практикум по микробиологии.– М.: Колос, 1979.– 216 с.
11. *Davelaar D.* Ecological significance of bacterial polyphosphate metabolism in sediments // *Hydrobiologia.*– 1993.– v.253.– P.179-192.
12. *Vadstein O., Olsen Y., Reinertsen H.* The role of planktonic bacteria in phosphorus cycling in lakes–Sink and link // *Limnol. Oceanogr.*– 1993.– v.38, № 7.– P.1539-1544.
13. *Gachter R., Meyer J.S.* The role of microorganisms in mobilization and fixation of phosphorus in sediments // *Hydrobiologia.*– 1993.– v.253.– P.103-121.

14. *Hupfer M., Gächter R., Rügger H.* Poly-P in lake sediments. 31P-NMR spectroscopy as a tool for its identification // *Limnol. Oceanogr.*– 1995.– v.40.– P.610-617.
15. *Hupfer M., Rube B., Schmieder P.* Origin and diagenesis of polyphosphate in lake sediments: A 31P NMR study // *Limnol. Oceanogr.*– 2004.– v.49.– P.1-10.
16. *Hupfer M., Gloess S., Grossart H.-P.* Polyphosphate accumulating microorganisms in aquatic sediments // *Aquatic Microb. Ecol.*– 2007.– v.47.– P.299-311.
17. *Gupta R., Singal R., Sankar A., Chander R.M., Kumar R. S.* A modified plate assay for screening phosphate-solubilizing microorganisms // *J. Gen. Appl. Microbiol.*– 1994.– v.40.– P.255-260.
18. *Муромцев Г.С.* К вопросу об использовании воднонерастворимых фосфатов почвенными микробами // *Докл. ВАСХНИЛ.*– 1955.– вып.5.– С.35-41.
19. *Методические указания по выделению микроорганизмов, растворяющих труднодоступные минеральные и органические соединения фосфора.*– Л.: Всесоюзный науч.-исслед. ин-т с/х микробиологии, 1981.– 19 с.

Материал поступил в редакцию 14.09.2011 г.

АННОТАЦИЯ. Оптимизирован состав питательной среды для выявления морских фосфатрастворяющих бактерий (ФРБ). Выявлена положительная корреляция между количеством гетеротрофных бактерий и фосфатрастворяющих. Численность ФРБ в исследованных образцах воды и донных отложений имеет сезонный характер. Наибольшее относительное их количество выявлено в донных отложениях.

ABSTRACT. Composition of nutrient medium for detection of marine phosphate-solubilizing bacteria (PSB) were optimized. A positive correlation between the number of heterotrophic bacteria and phosphate-solubilizing bacteria were found. The number of PSB in examined water and sediment samples have a seasonal nature. The largest relative number of PSB has been found in bottom sediments.