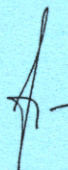


ПРОВ 2010

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ
им. А.О. КОВАЛЕВСКОГО**

**ДОРОШЕНКО
ЮЛИЯ ВАЛЕРЬЕВНА**



УДК 579.8:628.35(262.5)

**МИКРОФЛОРА СИСТЕМ ГИДРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ
МОРСКИХ ВОД**

03.00.17 – гидробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание научной степени
кандидата биологических наук

Севастополь – 2009

Диссертация является рукописью

Работа выполнена в Институте биологии южных морей им. А. О. Ковалевского
Национальной академии наук Украины, г. Севастополь

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор
Миронов Олег Глебович,
Институт биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского НАН Украины,
заведующий отделом
морской санитарной гидробиологии

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Рябушко Виталий Иванович,
Институт биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского НАН Украины,
заведующий отделом
морской фармакологии и биотестирования

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Ковалева Наталия Владимировна,
Одесский национальный университет
им. П. М. Палади
Института биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского НАН Украины,
старший научный сотрудник
Института биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского НАН Украины,
заведующий отделом
морской фармакологии и биотестирования

г. в 10 часов на заседании
Института биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского НАН Украины,
г. Севастополь, пр. Нахимова, 2

Института биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского НАН Украины,
г. Севастополь, пр. Нахимова, 2

2009 г.

Гавевская

А.В. Гавевская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

№ 10 а/р.

Актуальность темы. В самоочищении морской среды от загрязнения и формировании качества природных вод принимают участие все группы гидробионтов. Однако в условиях постоянного загрязнения естественные процессы самоочищения не справляются с потоками загрязняющих веществ, что приводит к деградации морских сообществ. Одним из путей решения проблемы является стимуляция самоочищающей способности морской среды (Миронов и др., 2003; Александров, 2008) с помощью специальных технических конструкций – систем гидробиологической очистки, разработанных в отделе морской санитарной гидробиологии ИнБЮМ НАНУ и апробированных в различных акваториях Черного моря (Миронов, 2006).

Первым звеном систем гидробиологической очистки являются активные обрастатели и фильтраторы, моллюски – мидии и митилястеры (Миронов и др., 1995, Миронов, 2006, Соловьева, 2008), которые, фильтруя большие объемы воды в процессе собственной жизнедеятельности и связывая в виде фекалий и псевдофекалий все загрязнители водной толщи, способствуют общему оздоровлению акватории. Активно расселяясь на поверхности основных носителей (коллекторов) гидробиологических систем, данная группа обрастателей создает дополнительные площади для расселения и других морских организмов, в первую очередь, микроорганизмов перифитона, составляющих второе звено гидробиологической системы и определяющих, в конечном итоге, интенсивность и мощность сформированного биофильтра по трансформации и утилизации загрязнения. Таким образом, изучение состава и функций микроорганизмов перифитона является составной частью общей проблемы самоочищения морской среды и необходимо, как для оценки «коэффициента полезного действия» существующих технических конструкций (систем гидробиологической очистки), так и для их возможного усовершенствования.

Исследования микробиального звена проводили в акватории Севастополя (Чёрное море). В качестве примеров различных конструкций систем гидробиологической очистки были выбраны системы, расположенные в Нефтегавани Севастопольской бухты.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Настоящая работа выполнена в рамках фундаментальных исследований ИнБЮМ НАН Украины по госбюджетным темам Национальной академии наук Украины «Изучение биогеохимических закономерностей формирования потоков радиоактивных, минеральных, органических веществ природного и техногенного происхождения и обусловленного ими экологического риска для популяций критических видов в Черном море»: «Потоки нефтяных углеводородов и органических веществ основных классов в акватории контактной зоны «суша – море»» (№ ДР 0103U001050, 2003 – 2007 гг.); «Изучение закономерностей

формирования ценоза обрастания пилотной установки системы гидробиологической очистки морской воды и его влияние на экологические условия в районе расположения» (№ 0107U005583, 2005 – 2009 гг.). В перечисленных темах диссертант участвовал в период обучения в аспирантуре в качестве исполнителя.

Цель и задачи исследования. Цель работы заключалась в определении динамики численности, биохимических особенностей и состава микрофлоры, участвующей в трансформации нефтяных углеводородов и других органических веществ в системах гидробиологической очистки.

Цель работы определила следующие задачи:

- изучить динамику численности бактерий перифитона систем гидробиологической очистки морской воды;
- выделить чистые культуры бактерий и определить их родовую принадлежность;
- выявить в микробном сообществе систем гидробиологической очистки дрожжи;
- выделить чистые культуры дрожжей и определить их видовую принадлежность;
- изучить рост бактерий и дрожжей перифитона на различных источниках углерода;
- провести сравнительную оценку преобразования нефтяных углеводородов и других органических веществ бактериями и дрожжами.

Объект исследования – микроорганизмы перифитона (обрастания).

Предмет исследования – численность, биохимические особенности и состав микроорганизмов перифитона (обрастания).

Методы исследований: комплексные методы гидробиологии и морской микробиологии (для выделения из перифитона и морской воды гетеротрофных бактерий и морских дрожжей), общей микробиологии (для оценки морфологических, культуральных и физиолого-биохимических особенностей полученных штаммов бактерий и дрожжей и их идентификации, для хранения культур морских бактерий и дрожжей на питательных средах), математической статистики (для анализа и оценки достоверности полученных данных).

Научная новизна полученных результатов. Получены систематические данные о распределении гетеротрофных микроорганизмов перифитона систем гидробиологической очистки, расположенных в акватории Севастопольской бухты (Нефтегавань). Уточнен современный родовой состав бактерий перифитона. Установлено, что преобладающей формой являются грамотрицательные, неспороносные, подвижные палочки, относящиеся к роду *Vibrio*. Получены новые данные о видовом составе морских дрожжей перифитона. Автором выделено 67 штаммов, отнесенных к 10 видам. Впервые для микроорганизмов перифитона выявлены некоторые биохимические особенности бактерий и дрожжей. Бактерии более активно росли на флотском мазуте и дизельном топливе, а дрожжи – на сырой нефти и феноле. Дрожжи, в отличие от

бактерий, лучше росли на крахмале и жире. Существенных различий между бактериями и дрожжами в использовании белка как единственного источника углерода и энергии не обнаружено. Автором установлено, что некоторые виды дрожжей перифитона способны сохранять не только жизнеспособность, но и активность даже при высоких концентрациях нефтепродуктов.

Практическое значение полученных результатов. Полученные количественные данные о различных группах гетеротрофных микроорганизмов, используемых в качестве биоиндикационных показателей, могут быть применены для оценки уровня загрязнения морской акватории. Выявленные физиолого-биохимические особенности бактерий и дрожжей являются новыми данными, которые необходимо использовать для более полной характеристики систем гидробиологической очистки, и разработки дальнейших рекомендаций для усиления их самоочищающей способности в хронически загрязняемых акваториях подобного типа. Полученные результаты дают основание рекомендовать при экологическом мониторинге загрязнения морской среды нефтяными углеводородами и другими органическими веществами вести учёт в сообществе микроорганизмов не только бактерий, но и морских дрожжей.

Личный вклад соискателя. Диссертант принимал непосредственное участие в сборе, обработке и анализе материалов. Им осуществлялись постановка научных задач, методические разработки, проведение лабораторных экспериментов, что подтверждается самостоятельностью публикаций основных материалов работы.

Апробация работы. Основные положения и результаты диссертации были представлены на конференции молодых ученых «Pontus Euxinus – 2005» (Севастополь, 2005), III Международной научно-практической конференции «Проблемы природопользования, устойчивого развития и техногенной безопасности регионов» (Днепропетровск, 2005), Международной научной конференции «Фундаментальные исследования важнейших проблем естественных наук на основе интеграционных процессов в образовании и науке» (Севастополь, 2006), III Международной конференции студентов и аспирантов «Молодь і поступ біології» (Львов, 2007), Международной конференции молодых ученых «Современные проблемы рационального природопользования в прибрежных морских акваториях Украины» (Севастополь, 2007), III Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, посвященной 100-летию со дня рождения выдающегося украинского лихтенолога М. Ф. Макаревич «Биоразнообразие. Экология. Эволюция. Адаптация» (Одесса, 2007), Международной научно-практической конференции «Перифитон и обростание: теория и практика» (Санкт-Петербург, 2008).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Украины, 7 – в материалах

международных и региональных конференций. Без соавторов написано 10 работ. В работе, опубликованной в соавторстве, вклад соискателя состоит в проведении лабораторной обработки проб и статистической обработки полученных данных, разработки цели исследования и обсуждении полученных результатов (вместе с руководителем), написании текста статьи. Из статьи, опубликованной в соавторстве, в диссертации использованы данные, полученные лично диссертантом. Права соавтора публикации не нарушены.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, 6 разделов, выводов, списка использованных источников (101 отечественных изданий и 74 иностранных). Работа изложена на 123 страницах машинописного текста, иллюстрирована 20 таблицами и 45 рисунками.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность и признательность научному руководителю – доктору биологических наук, профессору, заведующему отделом морской санитарной гидробиологии ИнБЮМ НАН Украины О. Г. Миронову, а также всем сотрудникам отдела морской санитарной гидробиологии ИнБЮМ за всестороннюю помощь в выполнении работы и критические замечания. Соискатель считает приятным долгом поблагодарить за ценные советы и рекомендации доктора биологических наук, профессора А. В. Гаевскую. Особую благодарность автор выражает доктору биологических наук, профессору С. С. Нагорной, кандидату биологических наук Т. В. Бабич (Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, г. Киев) за помощь в идентификации дрожжевых культур.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В данном разделе охарактеризованы морские микроорганизмы (бактерии и дрожжи). Рассмотрены ареалы их распространения и дана характеристика их роли в трансформации веществ и энергии. Отдельно рассмотрены микроорганизмы перифитона. Описаны этапы формирования микрообрастания. Обоснована необходимость выполнения исследований по теме диссертационной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Пробы обрастаний (друзы мидий) отбирались ежемесячно с января 2005 по февраль 2006 гг. с капроновых носителей (СГО–1) и с металлических элементов (СГО–2) (рис. 1). Для этого использовали скребок, на ручке которого закрепляли полиэтиленовые пакеты. Пробу (обрастания и вода), после поднятия на борт мотобота, переносили в стерильные пятилитровые пластмассовые вёдра с плотно прилегающими крышками. Одновременно ежемесячно отбирались пробы

морской воды в центре акватории Нефтегавани батометром. Во время отбора проб измеряли температуру воды.

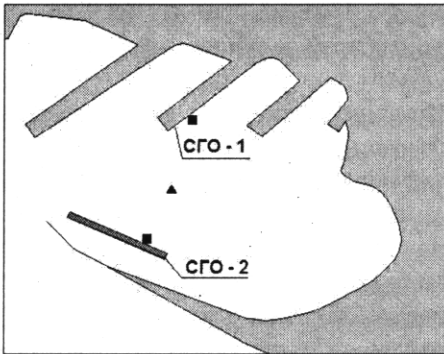


Рис. 1. Схема отбора проб в акватории Нефтегавани Севастопольской бухты (▲ – точка отбора проб воды)

После доставки в лабораторию вся последующая обработка проб проводилась в стерильных условиях. С поверхности раковин мидий скальпелем делали соскоб перифитона в чашки Петри, масса соскоба составляла 2 г. При транспортировке проб происходил частичный смыв микроорганизмов с обрастаний. Чтобы проследить, какое количество бактерий попадает в воду при гидродинамическом воздействии, из ведёр с обрастаниями отбирали пробы воды объёмом 20 мл. Указанное выше количество материала было

достаточно для проведения микробиологических исследований (Нетрусов, 2005, Родина, 1965, Егоров, 1976).

Для изучения динамики формирования обрастаний в феврале 2005 г. в акватории Нефтегавани на глубине около 2,5 м в районе СГО-2 были размещены изготовленные из цемента 12 кубиков с гранью 4×4 см и 12 обломков камней из мраморовидного известняка. Камни подбирали таким образом, чтобы площадь их поверхности приблизительно соответствовала таковой у бетонных кубиков, т.е. 0,0096 м² (Соловьева, 2008). Использованные материалы для экспериментальных образцов применялись при строительстве гидротехнических сооружений в прибрежной зоне Севастополя. Указанное количество образцов позволило отбирать их для анализа ежемесячно на протяжении года (с марта 2005 по февраль 2006 гг.) по 1 экз. Смывы с поверхности бетонного кубика и камня выполняли сразу после поднятия образцов на борт мотобота.

Всего обработано 27 проб обрастаний, 27 смывов с обрастаний, 14 проб воды из центра Нефтегавани, а также по 12 смывов с цементных кубиков и камней. Таким образом, исследованиями были охвачены перифитон, смывы с перифитона, формирующийся перифитон с экспериментальных образцов и морская вода.

В период 2006 – 2007 гг. проводили лабораторные исследования физиолого-биохимических свойств микроорганизмов, а также их идентификацию.

В соскобах перифитона, смывах с обрастаний и в пробах воды из Нефтегавани определяли общую численность гетеротрофных, нефтеокисляющих, липолитических, амилалитических и фенолоокисляющих бактерий. Таким

образом, были охвачены все основные группы бактерий, трансформирующие органические вещества. В смывах с кубиков и камней определяли только общее количество гетеротрофов и нефтеокисляющих бактерий, так как нас, прежде всего, интересовала динамика численности бактерий в процессе формирования обрастания.

Параллельно с количественным учётом микроорганизмов были выделены культуры бактерий и дрожжей. Накопительную культуру бактерий получали на пептонной воде (Родина, 1965), накопительную культуру дрожжей – на солодово-дрожжевом бульоне (Квасников, Щелокова, 1991).

Определение бактерий до рода проводили по Берджи (1997). Морфологические, культуральные и физиолого-биохимические свойства бактерий изучали согласно руководствам, Н. С. Егорова (1976), А. И. Нетрусова (2005) и В. В. Лысак (2005). Идентификацию дрожжей до вида проводили по (Kurtzman, 1998).

Способность и интенсивность роста дрожжевых и бактериальных культур на нефти и нефтепродуктах определяли посевом выделенных культур на среде Диановой–Ворошиловой с последующим добавлением источников углерода (Миронов и др., 1995). В качестве источника нефтяных углеводородов использовали дизельное топливо, флотский мазут и сырую нефть. Помимо того, в качестве единственного источника углерода и энергии использовали также белок, крахмал, жир, фенол. Рост на минеральной среде с нефтепродуктами оценивался визуально по характерным показателям роста микроорганизмов.

ЧИСЛЕННОСТЬ БАКТЕРИЙ ПЕРИФИТОНА

За исследуемый период общая численность гетеротрофных бактерий в перифитоне СГО–1 (капроновый носитель) колебалась от 150 тыс. до 45 млн. кл./г. Численность гетеротрофных микроорганизмов в перифитоне СГО–2 (металлический носитель) за период исследования колебалась от 25 тыс. до 25 млн. кл./г. Выявить зависимость между численностью гетеротрофных бактерий перифитона и температурой морской воды нам не удалось. По-видимому, температура не является основным фактором роста гетеротрофных бактерий, и их численность в большей степени зависит от других факторов, например, от наличия в воде органических веществ.

В динамике численности липолитических бактерий на обеих системах выявлен максимум в августе 2005 г., при этом численность липолитических бактерий на СГО–2 в 5,5 раз превышала таковую на СГО–1. Для СГО–2 максимальное значение составило $2,5 \cdot 10^6$ кл./г, а для СГО–1 – $4,5 \cdot 10^5$ кл./г. Минимальные значения численности липолитической группы бактерий в перифитоне СГО–2 и СГО–1 составили соответственно 95 кл./г и 45 кл./г.

При исследовании амилалитической группы бактерий в перифитоне систем гидробиологической очистки удалось выявить максимумы численности, приуроченные к тёплым месяцам, когда температура воды достигала 23 – 25 °С, как и для липолитических бактерий. Максимальная численность этой группы в перифитоне СГО-1 составляла $4,5 \cdot 10^5$ кл./г, а СГО-2 – $9,5 \cdot 10^5$ кл./г, что в 2 раза превышает максимум для СГО-1, минимальные показатели в перифитоне СГО-1 и СГО-2 составили соответственно 95 кл./г и 2500 кл./г.

О наличии связи между температурой морской воды и численностью липолитических и амилалитических групп микроорганизмов в перифитоне систем гидробиологической очистки свидетельствуют также полученные положительные значимые коэффициенты корреляции. Значения коэффициентов составили 0,63 для липолитических и 0,61 для амилалитических бактерий на СГО-1 и соответственно 0,59 и 0,58 на СГО-2. Таким образом, для указанных групп бактерий температура морской воды может быть основным ограничивающим фактором роста.

Численность нефтеокисляющих бактерий в перифитоне СГО-1 находилось в пределах 950 – 45 тыс. кл./г, что на 3 – 4 порядка ниже общей численности гетеротрофных микроорганизмов. В перифитоне СГО-2 численность нефтеокисляющих бактерий варьировала от 450 до 95 тыс. кл./г, что на 2 – 3 порядка меньше общей численности гетеротрофов. Численность микроорганизмов фенолоокисляющей группы варьировала от 150 кл./г до 45 тыс. кл./г для СГО-1 и от 250 кл./г до 25 тыс. кл./г – для СГО-2.

Выявить зависимости между температурой морской воды и численностью нефтеокисляющих и фенолоокисляющих бактерий перифитона не удалось. По-видимому, температура не является основным фактором роста этих групп микроорганизмов, и их численность в большей степени зависит, например, от наличия в акватории соответствующих загрязняющих веществ, т.е. нефтепродуктов и фенола.

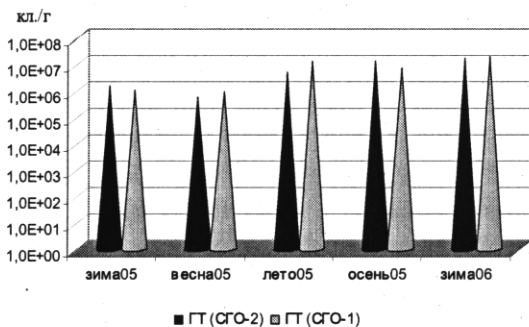


Рис. 2. Динамика численности гетеротрофных бактерий в перифитоне систем гидробиологической очистки

Отмечено, что численность гетеротрофных бактерий и её динамика на обеих системах носят сходный характер (рис. 2).

В целом, на исследуемых станциях установлены значительные колебания численности микроорганизмов на обеих системах. В частности, численность гетеротрофных бактерий

колебалось в пределах $10^4 - 10^7$ кл./г, липолитических – $10 - 10^6$ кл./г, амилолитических – $10 - 10^5$ кл./г, нефтеокисляющих и фенолоокисляющих бактерий – $10^2 - 10^4$ кл./г.

При отборах проб обрастаний на системах мы обратили внимание на то, что сформировавшееся сообщество обрастания покрыто значительным слоем взвешенного вещества (заилиение). При попытке снять часть обрастания оно образует «облако». Подобные процессы могут происходить в природе при чрезмерном накоплении детрита в перифитоне, а также при волновом воздействии, при этом частицы взвешенного вещества, попавшие в воду, постепенно оседают на дно. В связи с этим мы попытались определить численность микроорганизмов в воде, в которой транспортировались пробы обрастания, чтобы в этом случае в некоторой степени моделировались указанные выше процессы.

В воде, в которой доставлялись обрастания с обеих систем все исследуемые группы микроорганизмов были высеяны в 100 % проб. Исключение составляет группа липолитических бактерий в смыве с перифитона СГО-1, которую не удалось выявить в апреле. Численность гетеротрофных бактерий на 2-3 порядка ниже, чем в соскобах, и составляла $10^3 - 10^4$ кл./мл, численность нефтеокисляющих и фенолоокисляющих микроорганизмов составила $10 - 10^3$ кл./мл. Обнаружено значительное колебание численности липолитических и амилолитических бактерий $10 - 10^4$ кл./мл.

Одновременно с микробиологическим анализом перифитона и смывов с него, мы проводили микробиологический анализ морской воды Нефтегавани.

Следует отметить, что численность бактерий в морской воде между системами, по сравнению с перифитоном и даже смывами с обрастаний, по всем группам микроорганизмов ниже на несколько порядков, и не превышает 10^3 кл./мл для гетеротрофов.

Таким образом, во время гидродинамических воздействий происходит смыв части бактерий перифитона, и их концентрация в воде возле систем гидробиологической очистки повышается в несколько раз, достигая иногда значений перифитона. Следовательно, возле систем создается особая область, в которой численность бактерий выше средних значений для морской воды, а трансформация загрязняющих веществ происходит более активно, чем в открытых участках бухты.

Аналогичные процессы характерны для прибрежных наносов, где в условиях активного гидродинамического режима, наблюдается заметное увеличение численности микроорганизмов (почти в 100 раз) (Рубцова, 2003).

Биота искусственных гидротехнических сооружений, которые можно рассматривать как один из примеров гидробиологических систем, существенно влияет на общую продуктивность водоёма и формирование качества воды в

конкретном регионе (Миронов и др., 2003). Результаты натурального эксперимента с бетонными кубиками и обломками мраморовидного известняка представлены ниже (рис. 3–4). Численность гетеротрофов на бетоне превышала таковую на камне почти в 20 р. Количественные значения нефтеокисляющих бактерий на бетоне были выше в 3,5 р.

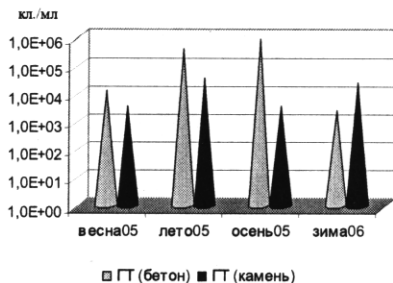


Рис. 3. Динамика численности гетеротрофных бактерий в смывах с бетонных кубиков и камней

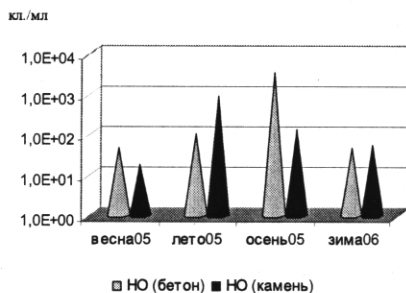


Рис. 4. Динамика численности нефтеокисляющих бактерий в смывах с бетонных кубиков и камней

Бетонные кубики, используемые в эксперименте, отличаются от обломков камней более пористой структурой. Благодаря этому на них происходило более активное оседание бактерий, что подтверждают полученные результаты.

КАЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОРСКИХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЕРИФИТОНА И МОРСКОЙ ВОДЫ

Всего за время исследования из перифитона систем гидробиологической очистки, расположенных в акватории Нефтегавани выделено 164 культуры бактерий. Выделенные микроорганизмы отнесены к 6 родам.

В целом, за весь период исследований с учетом смывов с обрастаний на обеих системах преобладали бактерии рода *Vibrio* – 36 %, 22 % выделенных из перифитона культур отнесены к роду *Marinococcus*, а 19 % – к роду *Pseudomonas*, 16 % – *Microbacterium*, 5 % – *Micrococcus* и только 2 % – *Bacillus*.

Определена родовая принадлежность бактерий, выделенных из воды в центре акватории Нефтегавани. Из воды было выделено 9 культур гетеротрофных бактерий, которые представлены только 4 родами. Преобладали микроорганизмы рода *Vibrio* – 34 %, а остальные бактерии отнесены к родам *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, которые представлены в равных долях – 22 %.

Наибольшее разнообразие родов отмечено в перифитоне систем гидробиологической очистки. Такой же таксономический состав характерен для смывов с СГО. Здесь, очевидно, происходил смыв бактерий при транспортировке. Пробы воды не отличаются значительным разнообразием бактерий, что

свидетельствует о том, что бактерий в основном концентрируются на твердых субстратах и взвешенном веществе.

В лабораторном эксперименте мы исследовали биохимическую активность всех выделенных бактериальных культур (164 штамма) по отношению к следующим загрязняющим веществам: сырой нефти, дизельному топливу, флотскому мазуту, а также фенолу, являющемуся побочным продуктом распада нефтепродуктов (рис. 5).

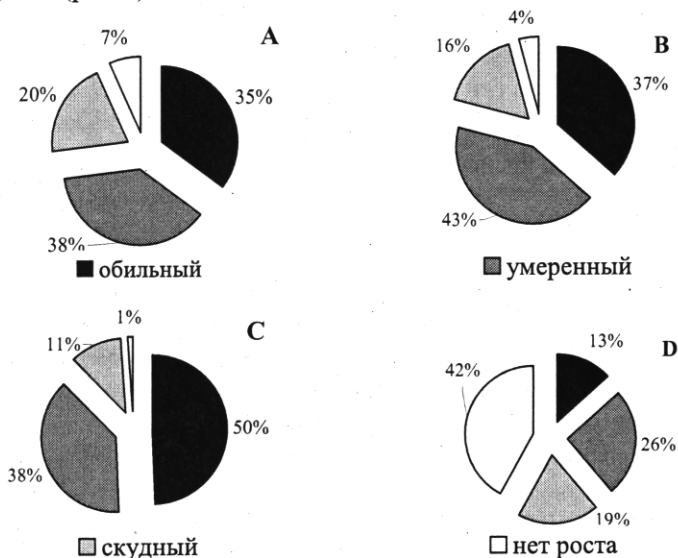


Рис. 5. Рост бактерий на минеральной среде с добавлением: А – сырая нефть; В – дизельное топливо; С – флотский мазут; Д – фенол

Наиболее активный рост бактерий наблюдали на минеральной среде (Д–В) с флотским мазутом – 99 % выделенных культур. С дизельным топливом и сырой нефтью бактерии росли практически одинаково. Обильный рост отмечен у 35 и 37 % культур бактерий соответственно на сырой нефти и дизельном топливе, причём рост бактериальных культур с нефтью вообще отсутствовал в 7 % случаев, а с дизельным топливом – в 4 %. Результаты нашего эксперимента показали, что на минеральной среде в присутствии фенола смогли жить и развиваться только 58 % выделенных бактерий.

Такие различия активности бактерий с разными нефтепродуктами, вероятно, связаны с их разной степенью токсичности, которая определяется количественными различиями химического состава, в частности содержанием летучих ароматических углеводородов и нафталинов (Hadson, 1977).

Кроме нефтепродуктов, в качестве единственного источника углерода и энергии мы использовали белок (пептон), жир и крахмал – органические вещества, часто присутствующие в морских акваториях. Способность микроорганизмов расти на этих источниках углерода демонстрирует табл. 1.

Таблица 1

Рост бактерий с различными источниками углерода

	Обильный, %	Умеренный, %	Скудный, %	Нет роста, %
Жир	42	31	21	6
Крахмал	29	36	24	11
Белок (пептон)	96	2	2	0

Результаты изучения физиолого-биохимических свойств микроорганизмов, выделенных из перифитона систем гидробиологической очистки и воды в районе их размещения, свидетельствуют об их разносторонней биохимической активности. Полученные результаты позволяют судить о том, что микроорганизмы перифитона способны использовать в качестве единственного источника углерода и энергии различные органические вещества, в том числе нефть и нефтепродукты. Кроме того, известно, что глубокая деградация углеводородов происходит лишь в присутствии достаточного количества кислорода. При его пониженной концентрации (ниже 1 мг/л) процесс замедляется. Следовательно, именно в перифитоне, где нет недостатка в кислороде и отмечена ярко выраженная биохимическая активность бактерий, процессы деградации загрязняющих веществ должны протекать наиболее активно.

МОРСКИЕ ДРОЖЖИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ПЕРИФИТОНА И МОРСКОЙ ВОДЫ

Всего за период исследований из перифитона систем гидробиологической очистки, смывов с перифитона, морской воды и опытных образцов (бетон и мраморовидный известняк) удалось выделить 67 культур дрожжей. Почти половина культур была выделена в июне – сентябре – 32 (48 %), когда температура воды составляла 20 – 25 °С. Даже без учёта смывов с перифитона более половины культур дрожжей (37) выделено на системах гидробиологической очистки; далее – на бетонных кубиках и камнях – 11 и 12 культур соответственно. Таким образом, около 90 % всех культур получено на твёрдых субстратах.

За весь период исследований на обеих системах с учетом смывов с обрастаний доминировал род *Candida* – 81 %, 14 % выделенных культур отнесены к роду *Rhodotorula*, и только 5 % – *Pichia*.

В первичных обрастаниях выделено 11 культур на бетонных кубиках и 12 культур на камнях, которые отнесены к двум родам (*Candida* и *Rhodotorula*) и шести видам. На камнях преобладающим видом был *Rhodotorula mucilaginosa* – 67 % от числа выделенных культур, а на бетоне доминировал вид *Candida krusei* – 64 %.

Из воды в декабре 2005 г. выделена только 1 культура дрожжей, которая отнесена к виду *Pichia anomala*.

Объединив данные по видовой принадлежности дрожжей во всех пробах, мы обнаружили, что наибольшая встречаемость отмечена у *Candida lambica* – 26 %. Далее идут *Candida krusei* – 24 % и *Rhodotorula mucilaginosa* – 22 %. На долю дрожжей, отнесенных к *Candida tropicalis*, приходится 9 %, *C. intermedia* – 7 %. Реже встречались *Pichia anomala* – 4 %, *Candida boidinii* – 3 %. Остальные виды – *Candida parapsilosis*, *C. famata*, *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* встречались в единичных случаях, на долю каждого из них приходится только по 1 %.

Представители рода *Candida* – *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. lambica*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* – встречаются в пресной и морской воде разных типов (Hagler, 1986). Их наличие указывает на попадание в воду хозяйственно-бытовых стоков. Из выделенных нами культур дрожжей ранее отмечены для Чёрного моря только два вида: *Rhodotorula mucilaginosa* и *Candida famata*, причём первый вид выделяли из морской воды с глубины до 300 м, а второй – до 1500 м (Новожилова, 1979). Остальные виды отмечены для Чёрного моря впервые.

Известно, что дрожжи принимают активное участие в преобразовании органических веществ в водоёмах, используя не только простые углеводы, но и более сложные органические вещества. Учитывая специфику исследуемой акватории, мы изучили способность дрожжей, всех 67 выделенных культур, использовать нефтепродукты в качестве единственного источника углерода и энергии (рис. 6).

Как видно из представленных на рис. 6 данных, наиболее активный рост наблюдался у 46 % культур дрожжей на феноле, 36 % на флотском мазуте и сырой нефти и только 26 % на дизельном топливе. Однако, следует отметить, что 5 % культур дрожжей не смогли развиваться в присутствии фенола.

Сравнивая приведённые данные, можно отметить, что дрожжи, выделенные из перифитона систем гидробиологической очистки, как и бактерии из того же источника, способны использовать нефть и нефтепродукты в качестве единственного источника углерода и энергии. Однако, если бактерии давали обильный рост на флотском мазуте и дизельном топливе, то дрожжи более активно росли на сырой нефти и феноле.

Способность дрожжей, равно как и бактерий, к росту на нефтепродуктах указывает на возможность расщепления последних в природных условиях в

водоёме. Следовательно, при оценке очистки воды от нефтяных загрязнений в составе микробоценозов морских водоёмов необходимо учитывать и дрожжи.

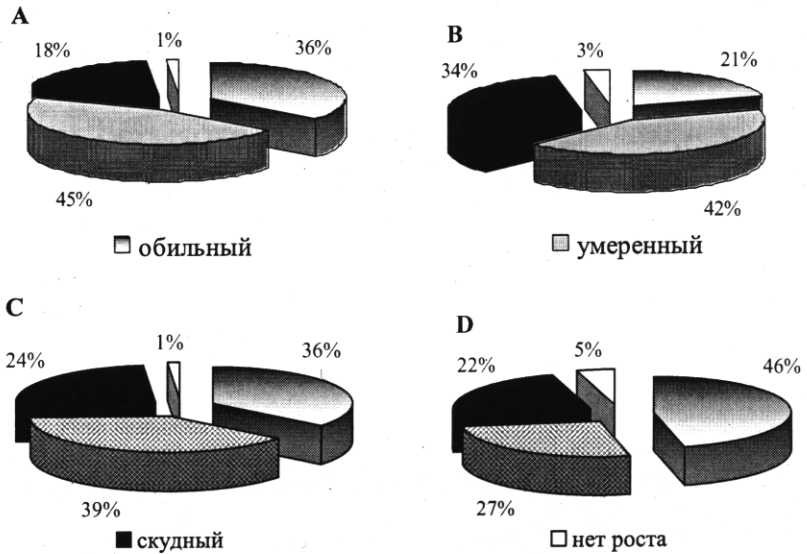


Рис. 6. Рост дрожжей на минеральной среде с добавлением: А – сырая нефть; В – дизельное топливо; С – флотский мазут; Д – фенол

В своих экспериментах, кроме нефтепродуктов, в качестве единственного источника углерода и энергии мы использовали также белок (пептон), жир и крахмал – органические вещества, которые часто присутствуют в морских акваториях (табл. 2).

Таблица 2

Рост дрожжей с различными источниками углерода

	Обильный, %	Умеренный, %	Скудный, %	Нет роста, %
Жир	54	30	13	3
Крахмал	31	61	5	3
Белок (пептон)	75	22	3	0

Все выделенные культуры микроорганизмов активно росли на белке (пептоне), хотя у дрожжей наблюдали активный рост только в 75 % случаев, а у

бактерий, как было показано ранее – в 96 %. Рассматривая биохимическую активность микроорганизмов в отношении жира и крахмала, следует отметить, что дрожжи, в отличие от бактерий, в ряде случаев лучше росли на этих источниках углерода.

Следовательно, дрожжи, обладая высокой биохимической активностью, участвуют в трансформации загрязняющих веществ в системах гидробиологической очистки.

РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕКОТОРЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ (БАКТЕРИИ, ДРОЖЖИ)

Преобладание в сообществе микроорганизмов различных систематических групп в определённой степени зависит от скорости их роста (Одум, 1986).

Для исследования процесса роста бактерий и дрожжей перифитона нами был использован автоматический анализатор «Биоскрин-С» с программой BIORTN. Он позволяет более детально изучать особенности физиологии микроорганизмов, в частности, характер роста культур определённых групп микроорганизмов.

Для каждой культуры определяли:

1. относительная максимальная плотность (биомасса) культуры ($B_{\text{max. отн.}}$, %)
2. относительный прирост ($\Delta B_{\text{max. отн.}}$, %)
3. средняя скорость прироста ($V_{\text{ср}} = \Delta B_{\text{max. отн.}} / \Delta t$)

Был исследован рост выделенных бактериальных и дрожжевых культур на пептоне и СДБ, селективной среде для дрожжей, причем культуры бактерий росли только на пептоне, а дрожжи, как на пептоне, так и на СДБ. Длительность эксперимента составляла 75 ч.

В эксперименте участвовало 4 культуры, две бактериальные и две дрожжевые:

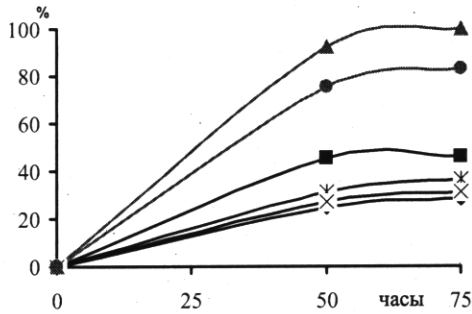
- № 101 (*Vibrio*) из смывов с обрастаний СГО-2;
- № 104 (*Vibrio*) из того же источника, что и № 101;
- № 1 (*Candida*) из обрастаний СГО-2;
- № 5 (*Candida*) из того же источника, что и № 1;

Для эксперимента нами выбраны культуры из бактерий – *Vibrio*, а из дрожжей – *Candida*, которые оказались представителями доминирующих родов в микроперифитоне систем гидробиологической очистки.

Результаты представлены на рис. 7. Они показали, что интенсивность роста дрожжей на СДБ была в 2-3 раза выше, чем на пептоне. Относительный прирост биомассы, как бактерий, так и дрожжей на пептоне незначительно отличался, а прирост биомассы дрожжевых культур на СДБ был выше на 20 %.

Таким образом, результаты исследования показали, что дрожжи в несколько раз активнее растут на специальной среде (СДБ), при этом нет существенных

различий между ростом бактерий и дрожжей, когда эти микроорганизмы растут на пептонной воде.



—◆— 101 (*Vibrio*) —■— 104 (*Vibrio*)
 —Ж— 1 (*Candida*) пенмон —X— 5 (*Candida*) пенмон
 —▲— 1 (*Candida*) СДБ —●— 5 (*Candida*) СДБ

Рис. 7. Рост относительной биомассы бактерий рода *Vibrio* и дрожжей рода *Candida*

концентраций дизельного топлива. Для этого были использованы культуры родов *Candida* и *Rhodotorula*.

Экспериментальные данные показали, что нефтепродукты (дизельное топливо) в высоких концентрациях на дрожжи рода *Rhodotorula* действует как ингибирующий фактор. Однако некоторые представители рода *Candida* могут жить и развиваться в присутствии нефтепродуктов.

ВЫВОДЫ

1. Впервые получены систематические данные о численности, особенностях распределения, таксономическом составе и биохимических особенностях микроорганизмов перифитона на различных вариантах систем гидробиологической очистки морской воды и оздоровления прибрежных акваторий.

2. Общее количество гетеротрофных бактерий в перифитоне колебалось от 10^4 до 10^7 кл./г. Численность липолитических — $10 - 10^6$ кл./г, амилалитических — $10 - 10^5$ кл./г и фенолоксиляющих бактерий — $10^2 - 10^4$ кл./г.

3. Близкие значения численности наблюдали в морской воде, в которой доставлялись пробы обрастаний: общее количество гетеротрофов $10^3 - 10^6$ кл./мл, численность липолитических, амилалитических бактерий составляла $10 - 10^5$ кл./мл, а нефтеоксиляющих и фенолоксиляющих бактерий колебалась от 10 до 10^4

Полученные результаты согласуются с данными, имеющимися в литературе. Добавление к питательной среде веществ, содержащих комплекс витаминов, аминокислот или сахаров, как в нашем случае, приводит к заметному стимулированию роста дрожжей.

С целью оценить устойчивость дрожжей в перифитонном сообществе в условиях аварийных разливов нефтепродуктов некоторые культуры дрожжей, выделенные из различных субстратов, проверялись на возможность их роста в присутствии высоких

кл./мл, что объясняется смывом с перифитона. Подобные явления могут происходить в море при гидродинамическом воздействии.

4. Численность гетеротрофных бактерий в акватории, где размещались гидробиологические системы ниже, чем в перифитоне на 4-5 порядков, что отражает закономерности распространения бактерий в море.

5. Численность гетеротрофов в смывах с бетонных кубиков варьировала от 10^2 до 10^6 кл./мл, а в смывах с мраморовидного известняка – от 10^3 до 10^4 кл./мл. Отмечено, что на пористом субстрате (бетон), общая численность гетеротрофов выше в 20 раз, чем на гладком субстрате (камень).

6. Из перифитона и смывов с перифитона выделено 155 культур бактерий. Преобладали бактерии рода *Vibrio* – 36 %, 22 % культур отнесены к роду *Marinococcus*, а 19 % – к роду *Pseudomonas*, 16 % – *Microbacterium*, 5 % – *Micrococcus* и только 2 % – *Bacillus*. Из морской воды выделено 9 культур бактерий, которые представлены только 4 родами. Преобладали микроорганизмы рода *Vibrio* – 34 %, а остальные бактерии отнесены к родам *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, которые представлены в равных долях – 22 %. Это свидетельствует о сходстве родовой структуры бактерий в морской акватории и перифитоне.

7. Выделенные культуры бактерий были способны использовать углеводороды нефти, а также белки, жиры и углеводы в качестве единственного источника углерода и энергии. На сырой нефтиросло 93 % штаммов, на дизельном топливе – 96 %, на флотском мазуте – 99 %, на феноле – 58 %. Все выделенные культуры бактерий могли использовать белок, жир – 94 % штаммов, крахмал – 89 %.

8. Впервые выделены дрожжи (66 культур) из перифитона систем гидробиологической очистки, которые отнесены к 3 родам и 10 видам. Наибольшая встречаемость отмечена у представителей видов *Candida lambica* (*Pichia fermentans*) – 26 %, *Candida krusei* (*Issatchenkia orientalis*) – 24 % и *Rhodotorula mucilaginosa* – 22 %, 9 % отнесены к *Candida tropicalis*, 7 % – *Candida intermedia*, по 3 % приходится на виды *Candida boidinii* и *Pichia anomala*, по 2 % – *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*), *Candida parapsilosis* и *Candida guilliermondii* var. *membranaefaciens*.

9. Экспериментально показано, что нефтепродукты (дизельное топливо) в высоких концентрациях на дрожжи рода *Rhodotorula* действует как ингибирующий фактор, однако представители рода *Candida* могут жить и развиваться в присутствии нефтепродуктов.

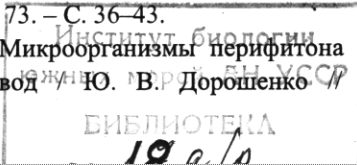
10. Выделенные культуры дрожжей, обладая высокой биохимической активностью, активно росли на пептоне – 100 %, использовали крахмал и жир – 97 %. Большинство дрожжевых культур могли использовать нефть или нефтепродукты в качестве единственного источника углерода и энергии.

Существенный рост наблюдался у 99 % культур дрожжей на сырой нефти и флотском мазуте, 97 % на дизельном топливе и 95 % на феноле.

11. Полученные данные по биохимическим особенностям дрожжей свидетельствуют об участии этой группы микроорганизмов в процессах самоочищения морской среды. Это дает основание рекомендовать при экологическом мониторинге вести учёт в сообществе микроорганизмов не только бактерий, но и морских дрожжей.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Дорошенко Ю. В. Изучение микрофлоры в системах гидробиологической очистки / Ю. В. Дорошенко // «Pontus Euxinus-2005»: IV всеукр. науч.-практ. конф., 24 – 27 мая 2005 г.: тезисы докл. – Севастополь, 2005. – С. 48–49.
2. Дорошенко Ю. В. Системы гидробиологической очистки как способ повышения качества природных вод / Ю. В. Дорошенко // Проблемы природопользования, устойчивого развития и техногенной безопасности регионов: III междунар. науч.-практ. конф., 3 – 8 октября 2005 г.: тезисы докл. – Днепрпетровск, 2005. – Т. 2. – С. 141–142.
3. Дорошенко Ю. В. Микрофлора нефтегавани Севастопольской бухты (Черное море) / Ю. В. Дорошенко // Морск. экол. журн. – 2005. – Отд. Вып. №1. – С. 33–37.
4. Дорошенко Ю. В. Морские дрожжи как компонент систем гидробиологической очистки морской среды / Ю. В. Дорошенко // Фундаментальные исследования важнейших проблем естественных наук на основе интеграционных процессов в образовании и науке: междунар. науч. конф.: тезисы докл. – Севастополь, 2006. – С. 125–126.
5. Дорошенко Ю. В. Морські дріжджі Нафтогавані Севастопольської бухти (Чорне море) / Ю. В. Дорошенко // Молодь та поступ біології: III між нар. наук. конф. студентів та аспірантів: збірник тез. – Львів, 2007. – С. 345–346.
6. Миронов О. Г. Нефтеокисляющие дрожжи перифитона систем гидробиологической очистки морских вод / О. Г. Миронов, Ю. В. Дорошенко // Морск. экол. журн. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 58–62. (Вклад автора – проведение исследований, обработка проб и анализ результатов, совместное написание текста статьи).
7. Дорошенко Ю. В. Микрофлора акватории в районе размещения систем гидробиологической очистки морских вод / Ю. В. Дорошенко // Экология моря. – 2007. – Вып. 73. – С. 36–43.
8. Дорошенко Ю. В. Микроорганизмы перифитона и их роль в улучшении качества морских вод / Ю. В. Дорошенко // Современные проблемы



- рационального природопользования в прибрежных морских акваториях Украины: междунар. конф. молодых ученых, 12 – 14 июня 2007 г.: тезисы докл. – Севастополь – Кацивели: НПЦ «ЭКОСИ-Гидрофизика», 2007. – С. 96–97.
9. Doroshenko J. Number and biochemical peculiarities of bacteria of periphyton and marine water in Oil Harbour (Sevastopol Bay) / J. Doroshenko // "Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution.": III International Young Scientists: materials of conference. – Odesa, 2007. – P. 243–244.
 10. Дорошенко Ю. В. Исследование ростовых характеристик бактериальных и дрожжевых культур перифитона систем гидробиологической очистки морских вод / Ю. В. Дорошенко // Экология моря, 2008. – Вып. 76. – С. 49–53.
 11. Дорошенко Ю. В. Гетеротрофные микроорганизмы перифитона и их роль в преобразовании загрязняющих веществ / Ю. В. Дорошенко // Перифитон и обрастание: теория и практика: междунар. науч.-практ. конф., 22 – 25 октября, 2008 г.: тезисы докл. – СПб, 2008. – С. 234–235.

АНОТАЦІЯ

Дорошенко Ю.В. - Мікрофлора систем гідробіологічного очищення морських вод - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.17 – гідробіологія. – Інститут біології південних морів НАН України, Севастополь, 2009.

Досліджені мікроорганізми (бактерії, дріжджі) перифітону систем гідробіологічного очищення морських вод, розташованих у Нафтогавані Севастопольської бухти (Чорне море).

Встановлено, що загальна кількість гетеротрофних бактерій у перифітоні коливалася від 10^4 до 10^7 кл./г. Чисельність ліполітичних бактерій – $10 - 10^6$ кл./г, амілолітичних – $10 - 10^5$ кл./г і фенолоокислюючих – $10^2 - 10^4$ кл./г. Чисельність гетеротрофних бактерій в акваторії, де розміщалися гідробіологічні системи, нижча ніж у перифітоні на 4-5 порядків, що відображає закономірності поширення бактерій у морі.

Із перифітону та змивів із перифітону виділено 155 культур бактерій. Переважали бактерії роду *Vibrio* – 36 %, 22 % культур віднесені до роду *Marinococcus*, а 19 % – до роду *Pseudomonas*, 16 % – *Microbacterium*. Досліджена біохімічна активність всіх виділених бактеріальних культур відносно таких забруднюючих речовин: сирої нафти, дизельного палива, флотського мазуту, а також фенолу. Найактивніший ріст бактерій спостерігали на мінеральному середовищі із флотським мазутом – 99 % виділених культур. З дизельним паливом та сирою нафтою бактерії росли практично однаково. Рясний ріст відзначено в 35 і 37 % культур бактерій відповідно на сирій нафті та дизельному паливі, причому

ріст бактеріальних культур з нафтою взагалі був відсутній в 7 % випадків, а з дизельним паливом – в 4 %. Результати експерименту показали, що на мінеральному середовищі в присутності фенолу змогли жити й розвиватися тільки 58 % виділених бактерій.

Уперше виділені дріжджі (66 культур) із перифітону систем гідробіологічного очищення, які віднесені до 3 родів і 10 видів. Найбільшу зустрічальність відзначено у представників видів *Candida lambica* - 26 %, *Candida krusei* - 24 % і *Rhodotorula mucilaginosa* - 22 %. Вивчена здатність дріжджів використовувати нафтопродукти як єдине джерело вуглецю й енергії. Найактивніший ріст спостерігався в 46 % культур дріжджів на фенолі, 36 % на флотському мазуті й сирій нафті і тільки 26 % на дизельному паливі. Однак, слід зазначити, що 5 % культур дріжджів не змогли розвиватися при наявності фенолу. Порівнюючи наведені дані, можна відзначити, що дріжджі, виділені з перифітону систем гідробіологічного очищення, як і бактерії з того ж джерела, здатні використовувати нафту й нафтопродукти як єдине джерело вуглецю й енергії. Однак, якщо бактерії давали рясний ріст на флотському мазуті й дизельному паливі, то дріжджі більш активно росли на сирій нафті та фенолі.

Експериментально показано, що нафтопродукти (дизельне паливо) у високих концентраціях на дріжджі роду *Rhodotorula* діють як інгібуючий фактор, однак представники роду *Candida* можуть жити й розвиватися в присутності нафтопродуктів.

Ключові слова: бактерії, дріжджі, перифітон, системи гідробіологічного очищення, Чорне море.

АННОТАЦИЯ

Дорошенко Ю.В. – Микрофлора систем гидробиологической очистки морских вод. – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.17 – гидробиология. – Институт биологии южных морей НАН Украины, Севастополь, 2009.

Исследованы микроорганизмы (бактерии, дрожжи) перифитона систем гидробиологической очистки морских вод, расположенных в Нефтегавани Севастопольской бухты (Чёрное море).

Установлено, что общее количество гетеротрофных бактерий в перифитоне колебалось от 10^4 до 10^7 кл./г. Численность липолитических – $10 - 10^6$ кл./г, амилолитических – $10 - 10^5$ кл./г и фенолоокисляющих бактерий – $10^2 - 10^4$ кл./г. Численность гетеротрофных бактерий в акватории, где размещались гидробиологические системы ниже, чем в перифитоне на 4-5 порядков, что отражает закономерности распространения бактерий в море.

Из перифитона и смывов с перифитона выделено 155 культур бактерий. Преобладали бактерии рода *Vibrio* – 36 %, 22 % культур отнесены к роду *Marinococcus*, а 19 % – к роду *Pseudomonas*, 16 % – *Microbacterium*.

Впервые выделены дрожжи (66 культур) из перифитона систем гидробиологической очистки, которые отнесены к 3 родам и 10 видам. Наибольшая встречаемость отмечена у представителей видов *Candida lambica* – 26 %, *Candida krusei* – 24 % и *Rhodotorula mucilaginosa* – 22 %.

Экспериментально показано, что нефтепродукты (дизельное топливо) в высоких концентрациях на дрожжи рода *Rhodotorula* действует как ингибирующий фактор, однако представители рода *Candida* могут жить и развиваться в присутствии нефтепродуктов.

Ключевые слова: бактерии, дрожжи, перифитон, системы гидробиологической очистки, Чёрное море.

SUMMARY

Doroshenko J. V. Microflora of the systems of the hydrobiological cleaning of marine waters. – Manuscript.

Thesis for scientific degree of candidate of biological sciences by specialty 03.00.17 – hydrobiology. – Institute of Biology of the Southern Seas, National Academy of Sciences of Ukraine, Sevastopol, 2009.

The role and functions of periphyton microorganisms of technical construction – hydrobiological system for cleaning of polluted waters placed in Oil Harbour (Sevastopol Bay, Black sea) are studied.

It's shown that total quantity of heterotrophic bacteria in periphyton changes from 10^4 to 10^7 cell/g. The quantity of other groups varies from 10 to 10^6 cell/g. The quantity of heterotrophic bacteria in area of hydrobiological system placing is decreased by 4 – 5 orders as compared with periphyton's quantity. This fact has reflected the law of bacteria expansion in sea water.

From periphyton 155 cultures of bacteria are selected. From those cultures prevailed the bacteria *Vibrio* – 36 %, 22 % cultures *Marinococcus*, and 19 % – *Pseudomonas*, 16 % – *Microbacterium*.

Yeasts (66 cultures) from the periphyton systems of the hydrobiological cleaning are first selected. The dominant representatives species composition were determined according to modern nomenclature: *Candida lambica* – 26 %, *Candida krusei* – 24 % and *Rhodotorula mucilaginosa* – 22 %.

The sea yeasts ability to grow on media with high concentrations of the diesel fuel was evaluated.

Keywords: periphyton, bacteria, yeasts, the systems of hydrobiological cleaning, Black sea.

Здано до набору 14.08.09 р. Підписано до друку 21.08.09 р.
Формат: 60х90 / 16. Папір офсетний. Наклад 100 прим.

Надруковано в друкарні «DigitPrint»,
ЧП Владикін В.В.
Севастополь, тел. (095) 850-50-28
e-mail: DigitPrint@gmail.com