

А. КОВАЛЕВСКИЙ»

69-й РЕЙС НИС «АКАДЕМИК

«НАУКОВА ДУМКА»
КИЕВ-1975

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО
ЗНАМЕНИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ
МОРЕЙ им. А. О. КОВАЛЕВСКОГО

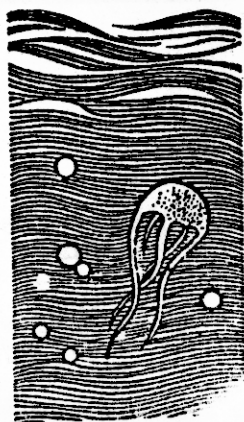
ПРОВ 98

ЭКСПЕДИЦИОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В СРЕДИЗЕМНОМ И ЧЕРНОМ МОРЯХ

В НОЯБРЕ - ДЕКАБРЕ 1971г.

Институт
Биологии южных морей
ВНЕДРОИНСТИТУТА

№ 25821



Синтез соединений кобаламиновой природы бактериальными сообществами из Черного моря

В работах последних лет большое внимание уделяется метаболической деятельности микробов, и в частности, синтезу кобаламинов. Способность к синтезу витамина В₁₂ широко распространена среди бактерий, выделенных из самых различных местообитаний, в том числе и из морских водоемов.

Поскольку кобаламины существенно влияют на рост и развитие водорослей, а тем самым и на продуктивность водоемов, во многих гидробиологических работах значительное внимание уделяется исследованию биосинтетической активности бактерий — продуцентов витамина В₁₂. Они выделены из морской воды, ила, с поверхности макрофитов, беспозвоночных и кишечника рыб.

Как правило, биосинтетическая активность бактерий изучается разными авторами с применением неидентичных методик: выделение и испытание культур проводится на различных по составу средах, применяются разные тест-организмы, изменяется и метод определения витамина. Все это затрудняет сопоставление количественных данных витаминсинтезирующей деятельности бактерий по абсолютным величинам.

Судя по доступной нам литературе, количество кобаламинов, синтезируемых бактериями, выделенными из морских водоемов, чаще всего составляет десятые и сотые доли наннограмма на 1 мл культуральной среды [3, 7]. Эти концентрации от 100 до 1000 раз превосходят содержание витамина В₁₂ в том же объеме морской воды [6, 8, 9]. Сведения о витаминсинтезирующей (по кобаламинам) активности морских

бактерий представлены материалами, собранными главным образом в прибрежных районах как в океанических областях, так и в Черном море. Все эти исследования проводились на чистых культурах с применением сред, чаще всего далеких по своему составу от среды обитания. Однако при оценке значения биосинтетической деятельности бактерий в биологической продуктивности водоемов первостепенное значение приобретает изучение их активности в условиях, приближенных к естественным. Учитывая, что в природе деятельность каждого отдельного вида бактерий зависит от сложившихся взаимоотношений внутри бактериальных популяций и совокупности условий внешней среды [1], мы считали рациональным исследовать биосинтетическую активность не отдельных видов морских бактерий, а деятельность бактериальных сообществ в целом. При этом основой среды для культивирования бактериальных популяций служила сама проба морской воды, не подвергавшаяся стерилизации, что обеспечило определенное приближение к естественным условиям.

Стерилизация добавок (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , дрожжевого экстракта), стимулирующих рост бактерий, осуществлялась отдельно, поскольку известно, что автоклавирование всех компонентов среды в виде смеси приводит к образованию ингибиторов [10].

В рейсе была поставлена задача дать сравнительную характеристику биосинтетической (по кобаламинам) активности бактериальных сообществ из различных глубин водной толщи как прибрежных, так и открытых районов Черного и Средиземного морей, в условиях, приближенных к естественным.

В данном сообщении приводятся материалы, касающиеся лишь Черного моря.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работы проведены на 6 станциях: 3 - в придунайском (4, 5, 7) и 3 - в глубоководных районах

Черного моря (1, 2, 8). В 12 милях от устья Дуная пробы отбирали только из приповерхностного (0–5 см) слоя воды специальным черпаком со вставляющимся в него стерильным стаканом [4].

В открытых областях Черного моря воду поднимали с различных глубин водной толщи (0, 25, 40, 50, 100, 150, 200, 500, 1000, 1500 и 2000 м) хлорвиниловыми батометрами сплошной проточности типа Ван Дорна, предварительно простерилизованными 96° спиртом.

С каждого горизонта проанализирована биосинтетическая активность бактериальных популяций в 3–4 пробах воды, что в общей сложности составило 91 определение.

Воду предварительно освобождали от планктонных организмов, размером более 1,0–2,5 мк^{*}). Для стимуляции накопления биомассы бактерий в количествах, достаточных для проведения анализа, в эти пробы вносили 1 мл экстракта, приготовленного по способу Калфедэ [5]. В качестве минеральной добавки использовали стерильные растворы K_2HPO_4 , KH_2PO_4 и NH_4NO_3 из расчета 1 г соли на 1 л среды. Таким образом, бактериальные сообщества развивались в условиях, приближенных к естественным. Отказ от жесткой стерилизации среды гарантировал отсутствие возникающих при этом ингибирующих факторов. Колбы выдерживали при температуре 24–26° С четверо суток. По окончании инкубации бактериальную биомассу отделяли центрифугированием (при 8000 оборотах/мин), избыток влаги оттягивали фильтровальной бумагой, а затем переносили на предварительно взвешенное ровное стекло. Навеску определяли на торсионных весах. Бактериальную массу вместе со стеклом помещали в пробирку с дистиллированной водой и стабилизатором KSCN. Содержание витамина определяли

^{*}) С этой целью пробы воды в количестве 50 мл фильтровали через бумажный фильтр с синей полосой в стерильные колбы на 250 мл.

пробирочным методом, используя штамм *E. coli* -113-3 [2] в расчете на 1 г сырой бактериальной массы.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ черноморских проб воды показал, что популяции бактерий, способные синтезировать кобаламины, встречаются как в прибрежном, так и открытых районах Черного моря (табл. 1, 3).

Наиболее высокой биосинтетической активностью обладали бактериальные сообщества, обитающие в приповерхностном слое воды на станциях 4 и 5, расположенных на траверзе гирла р. Дунай (в 12 милях от берега). В придунайском районе в 6 случаях (66,6%) бактерии синтезировали кобаламины в тысячах (от 1129,4 до 3428,5) и в трех - в сотнях нг/г сырого веса бактерий (172,2 - 691,7, табл. 2).

На станциях глубоководных районов Черного моря (станции 1, 2 и 8) продуценты витамина B_{12} обнаружены как в кислородной, так и в сероводородной зонах. При этом величины, характеризующие активность бактерий (табл. 1 и 3), практически одинаково широко колебались при наличии (0-50 м) или отсутствии (200-2000 м) кислорода, а также в промежуточном слое - 100-150 м (33,3 - 1987,4, 16,6-2717,6 и 35,2-1225,0 нг/г сырого веса бактерий соответственно).

Всюду преобладали формы, способные синтезировать кобаламины в сотнях наннограмм (от 54,5 до 69,2% проб), в том числе и в приповерхностном слое воды (90%). Следует отметить, что в слое 100-150 м относительно реже встречались бактериальные сообщества, продуцирующие наименьшие количества витамина. В то же время здесь отмечено самое большое число случаев (18,2 против 3,8% в кислородной и 9,1% в сероводородной зонах), когда они синтезировали кобаламины в количестве тысяч нг/г сырого веса. Это дает основание полагать, что микробные популяции, обладающие высокой биосинтетической активностью (сотни и тысячи нг), наиболее распро-

Таблица 1

Биосинтетическая активность бактериальных популяций (в $\mu\text{г}/\text{г}$ сырого веса бактерий), выделенных из водной толщи в открытых районах Черного моря

Гори- зонт, м	1 станция				2 станция				3 станция			
	п о в т о р н о с т и											
	1	2	3	сред- няя	1	2	3	сред- няя	1	2	3	сред- няя
0	100,0	234,0	320,0	218,0	202,2	209,2	1987,4	799,6	163,1	170,0	206,6	211,1
25	33,3	120,0	586,0	246,6	295,1	568,4	825,0	562,8	-	-	-	-
40	55,5	167,6	173,8	132,3	36,6	38,2	53,3	42,7	-	-	-	-
50	-	140,7	711,1	425,9	-	76,5	98,3	87,4	-	-	-	-
100	-	316,4	388,2	352,3	91,2	112,6	116,2	106,6	-	-	-	-
150	35,2	272,2	317,6	208,3	-	-	-	-	716,3	1000,0	1225,0	980,4
200	189,2	205,7	200,0	231,6	45,4	45,4	53,6	48,3	-	-	-	-
500	671,4	744,0	2717,6	1377,6	16,6	63,7	77,8	52,7	-	-	-	-
1000	349,9	360,0	360,0	356,3	17,8	26,2	96,9	46,9	92,2	117,2	381,1	196,8
1500	93,3	956,8	2092,3	1047,4	65,3	104,3	110,3	93,3	-	-	-	-
2000	187,5	255,7	2680,0	1041,0	133,3	157,9	705,9	332,4	-	-	-	-

Таблица 2

Распространенность бактериальных популяций, обладающих различной биосинтетической активностью*) в глубоководных и придунайском районах Черного моря (в процентах от числа определений)

Район исследования	С л о й	Число определений	Десятки	Сотни	Тысячи
Глубоководные	Приповерхностный 0-5 см	10	0	90 (100,0-320,0)	10 (1984,4)
	25-50 м	16	43,8 (33,3-98,3)	56,3 (120,0-825,0)	0
	0-50 м	26	26,9 (33,3-98,3)	69,2 (100,0-825,0)	3,8 (1984,4)
	Промежуточный 100-150 м	11	18,2 (35,2-91,2)	63,6 (112,6-716,3)	18,2 (1000,0-1225,0)
	Сероводородный 200-2000 м	33	36,4 (16,6-96,9)	54,5 (104,3-956,8)	9,1 (1041,0-2717,6)
Придунайский	Приповерхностный 0 - 5 см	9	0	33,3 (172,2-691,7)	66,6 (1129,4-3428,5)
*) Цифры в скобках показывают пределы колебания содержания кобаламинов в мг/г сырого веса бактериальной массы.					

Таблица 3

Биосинтетическая активность бактериальных популяций (в нг/г сырого веса бактерий) в поверхностном слое воды на станциях, расположенных в придунайском районе (в 12 милях от берега)

Номер станции	П о в т о р н о с т ь		
	4 - я	5 - я	7 - я
1	2144,6	1129,4	172,2
2	2162,7	1342,1	317,6
3	3428,5	2258,8	691,7
Средняя	2578,6	1576,7	398,8

странены в промежуточной зоне (81,8% против 73,0 и 63,6%).

Однако максимальные величины биосинтеза (табл.1) отмечены для бактерий сероводородной зоны (2092,3 - на 1500 м; 2680,0 - на 2000 и 2717,6 - на 500 м). Таким образом, в сероводородной области Черного моря встречаются бактериальные сообщества, не уступающие по своей витаминсинтезирующей активности формам, выделенным в придунайском районе Черного моря.

Стопроцентная встречаемость во всех 33 пробах, отобранных с глубин 200-2000 м, бактерий-продуцентов кобаламинов дает основание считать, что витамин В₁₂, найденный А.Т.Супруновым с сотрудниками [6] в сероводородной зоне Черного моря, является продуктом жизнедеятельности глубинной микрофлоры.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Виноградский С.Н. Микробиология почвы. Методы почвенной микробиологии. М., Изд-во АН СССР, 1952, с.387-470.

2. Куцева Л.С. Микробиологические методы определения витамина В₁₂. - В кн.: Витаминные ресурсы и их использование. М., Изд-во АН СССР, 1961, 134-144.
3. Нижегородова Л.Э. Поширення бактерії - продуцент в вітаміну В₁₂ у прісноводних мулах гірла Дунаю. - Мікробіологічний журн., 1967, т.29, № 4, 350-351.
4. Пшенин Л.Н. Об азотфиксирующих бактериях приповерхностного слоя воды в Черном море. - В кн.: Труды Севастоп. биол. станции, т.15. Севастополь, Изд-во "Флаг Родины", 1964, 3-7.
5. Родина А.Г. Методы водной микробиологии. М.-Л., "Наука", 1965, 53-54.
6. Супрунов А.Т., Бенжицкий А.Г., Бугаева Л.Н. Некоторые данные о содержании и распределении витамина В₁₂ в прибрежной зоне Черного моря. - В кн.: Динамика вод и вопросы гидрохимии Черного моря. Киев, "Наукова думка", 1967, 133-142.
7. Gandhi N.M. a Freitas I.M. The production of vitamin B₁₂-like substances by marine microorganismes. II Studies of nutrition. - Proceed. Indian. Acad. Sci., 1964, sec. B, 59, 1, 33.
8. Droop M.R. Vitamine B₁₂ in marine ecology. - Nature, 1957, 180, 1041-1042.
9. Menzel D.W. and Spatch I.P., Occurenci of vitamin B₁₂ in the Sargasso sea. - Limnol. Oceanogr., 1962, 7, 2, 151-154.
10. Мейнелл Дж., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология. М., "Мир", 1967.