

*Кисели, Вельсина, Вайва, Арте
дурри, Аюдор, мору, Бейтос Карогах*

ISSN 0203-4646

ЭКОЛОГИЯ МОРЯ



17

1984

17. *Peters J.* Hygienisch-bacteriologische Untersuchungen des Küsten-Meerwassers im Bereich der Nordsee. — Insel Sylm. — Helgoland Wiss. Meeresuntersuch., 1970, 21, N 3, S. 310—319.
18. *Plissier M.* L'inactivation dans l'eau de mer et l'eau d'alimentation de certains enterovirus. — Arch. gestamt. Virusforsch., 1963, 13, N 1/3, s. 76—81.
19. *Rosenfield W. D., Zobell C. E.* Antibiotic production by marine microorganisms. — J. Bacteriol., 1947, 54, p. 393—398.
20. *Vaccaro R. F., Briggs M. P. et al.* Viability of escherichia coli in sea water. — Am. J. Publ. Hlth., 1950, 40, p. 1257—1266.
21. *Waksman S. A., Hotchkiss M.* Variability of bacteria in sea water. — J. Bacteriol., 1937, 33, p. 389—400.
22. *Zobell C. E.* Bactericidal action of sea water. — Proc. Soc. Exp. Biol. (New York), 1936, 34, N 2, p. 113—116.

Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского
АН УССР, Севастополь

Получено 21.10.82

L. E. NIZHEGORODOVA, L. M. NIDZVETSKAYA

TAXONOMIC COMPOSITION AND PROPERTIES OF ANTAGONIST BACTERIA IN THE NORTH-WESTERN PART OF THE BLACK SEA

Summary

The paper presents results of experiments on the antagonistic activity in the saprophytic bacteria isolated from waters in the north-western part of the Black Sea. Different relative amounts of antibiotic producers are observed in a zone of the greatest land effect (the mouth and littoral regions) and in the open part of the region in question. The taxonomic composition of antagonist bacteria, the spectrum of their antibiotic activity as well as data on various resistance of intestinal bacteria to antagonist bacteria within one genus are presented.

УДК 576.8.095.23:551.46.09:628:62—634.2 (262.5)

А. А. ЛЕБЕДЬ

ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОФЛОРЫ ДОННЫХ ОСАДКОВ, УЧАСТВУЮЩЕЙ В ПРОЦЕССАХ РАЗЛОЖЕНИЯ УГЛЕВОДОРОДОВ В АНАЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ

При загрязнении морской среды недостаток кислорода отмечается иногда на довольно больших пространствах некоторых морей, что приводит к изменению естественных процессов самоочищения. Развитие анаэробных процессов задерживает окисление органических веществ, способствует накоплению их в донных осадках, приводя к хроническому загрязнению акватории. Это явление особенно характерно для такого токсиканта, как нефть и нефтепродукты.

Изучение нефтеокисляющей микрофлоры в донных осадках Черного моря [3, 4] позволило получить данные о закономерности распространения и некоторых физиолого-биохимических особенностях микроорганизмов данной группы. Однако как в морской воде, так и в грунтах исследовалась аэробная микрофлора. В грунтах, как показали химические исследования [4], только в верхнем тонком слое преобладают окислительные процессы, а ниже его отмечалась восстановительная зона. В анаэробных условиях процессы разложения нефти проходят значительно медленнее, чем в аэробных [8, 9], а данные по трансформации углеводородов в грунтах Черного моря весьма ограничены в литературе.

В связи с этим проводились многомесячные эксперименты по изучению динамики численности анаэробных микроорганизмов, являющихся составной частью биоценоза донных осадков и принимающих участие в окислении углеводородов нефти и нефтепродуктов в грунтах. Грунт

отбирали в Севастопольской бухте на глубине 15 м дночерпателем площадью захвата 0,025 м². Он представлял собой плотный ил темного цвета с тонким окисленным верхним слоем и сильным запахом сероводорода. Наличие в донных осадках верхнего окисленного слоя и идущей за ним восстановленной зоны свидетельствует о том, что к восстановленной зоне нет доступа газообразного кислорода [10]. Следовательно, взятый нами для эксперимента ил из восстановленной зоны (без верхнего окисленного слоя) не содержал кислорода. Это подтверждается и присутствием в нем сероводорода. Анализ показал, что при экстракции 100 г суховоздушного грунта в нем содержалось 4,2 г экстрагируемых CCl₄ веществ, значительную часть которых составляли нефтепродукты.

Опыты ставили в медицинских склянках емкостью 0,5 л с пробками из вакуумной резины и металлическими держателями для пробок. В склянки помещали 5 г сырого грунта и доверху заполняли их средой Зейкуса [11], насыщенной смесью газов Н₂ + СО₂ (80 % + 20 %). Для окончательного вытеснения кислорода склянки на 1/3 заполняли аргоном при помощи двух медицинских игл. Было поставлено два варианта опытов. В I варианте присутствовали только грунт и среда Зейкуса, в контроль добавляли 1 мл формалина для нейтрализации деятельности микроорганизмов. Во II варианте после заполнения склянок аргоном медицинским шприцем вводили 0,1 мл нефти, в контроль также добавляли нефть и формалин. Таким образом, количество нефтепродуктов во II варианте увеличилось более чем на 50 %. Все опыты ставили в двух повторностях. Содержимое склянок из каждого варианта сразу было проэкстрагировано для определения исходного количества в них веществ, экстрагируемых CCl₄. Склянки выдерживали в термостате при температуре 30—32 °С в течение 7 месяцев. Потемнение среды и появление черного осадка сернистого железа свидетельствовали об отсутствии кислорода в экспериментах. Периодически из склянок при помощи медицинских игл отбирали пробы для определения в них численности анаэробных групп микроорганизмов.

Учет анаэробных и условно-анаэробных микроорганизмов осуществляли при высеве их на соответствующие среды: сульфатвосстанавливающие и денитрифицирующие бактерии выращивали на средах, описанных С. И. Кузнецовым и В. И. Романенко [7]; биоценоз бродильных микроорганизмов получали по методике, указанной в статье Е. П. Розановой [6]. Углекислородокисляющие микроорганизмы выращивали на минеральной среде следующего состава (г/л): NH₄NO₃ — 1,0; KH₂PO₄ — 1,0; K₂HPO₄ — 1,0; MgSO₄ — 0,2; CaCl₂ — 0,02; FeCl₃ — 2 капли; NaCl — 16,0. Нефть вносили в пробирки на кусочках стерильной фильтровальной бумаги перед заполнением их средой. Численность анаэробных микроорганизмов определяли методом предельных разведений, которые готовили в стерильном физиологическом растворе. По 1 мл посевного материала соответствующего разведения помещали в стерильные пробирки емкостью 50 мл для учета сульфатвосстанавливающих и углекислородокисляющих бактерий и в стерильные пенициллиновые склянки для учета денитрифицирующих и бродильных микроорганизмов. Соответствующие среды наливали в пробирки и склянки доверху и закрывали их пробками так, чтобы не оставалось пузырьков воздуха. Для удаления кислорода среды перед заполнением кипятили и быстро охлаждали. В качестве восстановителя использовали стерильный раствор сульфида натрия. Время инкубации посевов в термостате составляло 15—20 дней при температуре 30—32 °С. Наличие сульфатредуцирующих бактерий определяли по помутнению и потемнению среды, образованию темного осадка и сероводорода. О развитии углекислородокисляющих бактерий судили по помутнению среды и образованию бактериальной пленки вокруг кусочка фильтровальной бумаги с нефтью, о наличии денитрифицирующих и бродильных микроорганизмов — по образованию колоний и разрывов в агаризованной среде.

Таблица 1. Изменение численности анаэробных микроорганизмов донных осадков в среде, кл/мл

Группа микроорганизмов*	Первоначальное количество	I вариант		II вариант	
		3,5 месяца	7 месяцев	3,5 месяца	7 месяцев
Углеродородокисляющие	10^3	10^7	10^3	10^7	10^4
Сульфатвосстанавливающие	10^7	10^6	10^4	10^6	10^5
Бродильные	10^6	10^6	10^7	10^6	10^5
Денитрифицирующие	10^5	10^3	10^9	10^4	10^6

* Группа метанообразующих микроорганизмов в данных экспериментах не определялась.

Численность анаэробных групп микроорганизмов определяли перед постановкой опыта, затем через 3,5 и 7 месяцев. Полученные данные приведены в табл. 1. Как видим, численность углеродородокисляющих микроорганизмов в среде значительно увеличивается к середине опыта (от 10^3 до 10^7 кл/мл), уменьшаясь снова к концу опыта до первоначальных величин. Бактерии этой группы, в частности рода *Pseudomonas*, по данным В. А. Кузнецовой и В. М. Горленко [1], являются факультативными анаэробами и могут активно развиваться в анаэробных условиях. В сообществе с углеродородокисляющими бактериями сульфатредукторы принимают участие в разложении продуктов окисления нефти. В связи с тем что сульфатвосстанавливающие микроорганизмы в процессе своей жизнедеятельности могут использовать только продукты метаболизма углеродородокисляющих бактерий, а не углеводороды нефти [2], высокая численность сульфатвосстанавливающих бактерий в исходной пробе грунта (10^7 кл/мл) может свидетельствовать о наличии в донных осадках окисленных продуктов нефти. В течение опыта количество микроорганизмов этой группы постепенно уменьшается до 10^6 кл/мл через 3,5 месяца. Через 7 месяцев их число составило 10^4 кл/мл в I варианте и 10^5 кл/мл — во II варианте. В связи с этим можно предположить, что при внесении нефти через 7 месяцев в опыте II варианта находилось больше окисленных компонентов ее, которые доступны сульфатвосстанавливающим микроорганизмам. Количество бродильных микроорганизмов в экспериментах составило 10^6 кл/мл и изменилось только к концу опыта. На изменение их численности, очевидно, также оказало влияние добавление сырой нефти. На особую роль бродильных микроорганизмов в бактериальном окислении нефти при последовательном воздействии на нее углеродородокисляющих и бродильных микроорганизмов указывает в своей работе Т. Н. Назина [5].

Сопутствующей микрофлорой при анаэробном разложении нефти является группа денитрифицирующих микроорганизмов [8]. В наших экспериментах численность денитрификаторов уменьшилась через 3,5 месяца на 1—2 порядка по сравнению с исходными данными, через 7 месяцев количество их возросло до 10^6 — 10^9 кл/км. Параллельно с увеличением денитрифицирующих микроорганизмов происходит уменьшение численности сульфатвосстанавливающих бактерий. По данным Т. Л. Симакowej [8], некоторые штаммы денитрифицирующих бактерий подавляют жизнеспособность сульфатвосстанавливающих микроорганизмов. Кроме того, ею было установлено, что процесс изменения углеводородных фракций наиболее активно проходит под влиянием биоценоза бактерий, в котором денитрифицирующие бактерии преобладали над сульфатвосстанавливающими. В нашем эксперименте в микробиоценозе наблюдалась подобная картина — группа денитрифицирующих бактерий преобладали над сульфатвосстанавливающими к концу опыта.

Таблица 2. Весовые изменения экстрагируемых CCl_4 веществ из донных осадков и сырой нефти при воздействии анаэробной микрофлоры

Условия опыта	Навеска, мг		Потери	
	Взято в опыт	Осталось через 7 месяцев	мг	% к взятой в опыт навеске
I вариант				
контроль	47,15	46,40	0,75	1,7
опыт	47,15	32,05	15,10	32,1
II вариант				
контроль	112,65	98,50	14,15	12,6
опыт	112,65	59,00	53,65	47,7

Возможно, этим соотношением в биоценозе микроорганизмов можно объяснить полученные нами изменения в весовой части нефтепродуктов в анаэробных условиях (табл. 2).

Из данных табл. 2 следует, что в I варианте, где сырая нефть в эксперименты не добавлялась, за 7 месяцев количество экстрагируемых нефтепродуктов в опыте уменьшилось на 32,1 %, в контроле эта разница составила всего 1,7 %.

Поскольку во втором варианте добавлялась сырая нефть, у которой не были удалены легкие фракции, можно полагать, что значительная потеря в контроле (12,6 %) идет за счет легких фракций. Если взять потерю экстрагируемых CCl_4 веществ, которые были внесены в эксперимент с донными осадками за 1,7 %, то изменения за счет улетучивания легких фракций составляют $12,6 - 1,7 = 10,9$ %. Вычитая данную разницу из опыта второго варианта, получим возможную величину окисления нефти, которая составляет $47,7 - 10,9 = 36,8$ %, что на 4,7 % выше, чем в первом варианте. Это дает основание полагать, что эти 4,7 % приходятся на окисление внесенной сырой нефти.

Таким образом, в анаэробных условиях за 7 месяцев в среде Зейкуса произошли значительные изменения в микрофлоре донных осадков. Весовые изменения нефтепродуктов подтверждают слабо идущие в анаэробнозе процессы бактериального разложения углеводов.

1. Кузнецова В. А., Горленко В. М. Развитие углеводородокисляющих бактерий в анаэробных условиях. — Прикл. биохимия и микробиология, 1965, 1, вып. 6, с. 623—626.
2. Кузнецова В. А., Горленко В. М. Влияние температуры на развитие микроорганизмов из заводняемых пластов Ромашкинского нефтяного месторождения. — Микробиология, 1965, 34, вып. 2, с. 329—334.
3. Миронов О. Г. Бактериальная флора донных осадков. — В кн.: Основы биологической продуктивности Черного моря. Киев: Наук. думка, 1979, с. 199—207.
4. Миронов О. Г., Кирюхина Л. Н., Кучеренко М. И., Тархова Э. П. Самоочищение в прибрежной акватории Черного моря. — Киев: Наук. думка, 1975, — 142 с.
5. Назина Т. Н. Образование молекулярного водорода под воздействием пластовой микрофлоры на нефть. — Микробиология, 1981, 50, вып. 1, с. 163—166.
6. Назина Т. Н., Розанова Е. П. Экологические условия распространения метанообразующих бактерий в нефтяных пластах Апшерона. — Там же, 1980, 49, вып. 1, с. 123—127.
7. Романенко В. И., Кузнецов С. И. Экология микроорганизмов пресных водоемов. — Л.: Наука, 1974. — 193 с.
8. Симакова Т. Л., Колесник З. А., Норенкова И. К. К изучению микробиоценозов, вызывающих изменение нефтей и их компонентов в анаэробных условиях. — В кн.: Преобразование нефтей микроорганизмами. Л.: ВНИГРИ, 1970, с. 167—183.
9. Таусон В. О. Основные положения растительной биоэнергетики. — М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1950. — 550 с.
10. Shelton T. B., Hunter J. V. Anaerobic decomposition of oil in bottom sediments. — Water. Pollut. Contr. Fed., 1975, 47, N 9, p. 2256—2270.
11. Zeikus J. G. The Biology of methanogenic bacteria. — Bacteriol. Rev., 1977, 41, N 2, p. 514—541.

CHANGES IN BOTTOM SEDIMENT MICROFLORA PARTICIPATING IN HYDROCARBON DECOMPOSITION UNDER ANAEROBIC CONDITIONS

Summary

Long-term experiments were conducted to study quantity dynamics of the anaerobic bottom sediment microflora in the Zeikus medium. For 7 months variations in quantity were observed in hydrocarbon-oxidizing, sulphate-reducing and denitrifying microorganisms. The number of hydrocarbon-oxidizing bacteria increased considerably by the middle of the experiment (from 10^3 to 10^7 cell/ml), by the end of the experiment it fell to the initial values. By the end of the experiment a group of denitrifying microorganisms prevailed over sulphate-reducing ones in the microbiocenosis. It is found that under anaerobic conditions oxidation of crude oil is extremely slow.

УДК 591.524.11(262.113)

Г.-В. В. МУРИНА

ПЕРВЫЕ СВЕДЕНИЯ ПО КОЛИЧЕСТВЕННОМУ РАСПРЕДЕЛЕНИЮ И ТРОФИЧЕСКИМ ГРУППИРОВКАМ МАКРОЗООБЕНТОСА БАНОК АЛЬБОРАНСКОГО МОРЯ

Большая часть исследований зообентоса шельфа Средиземного моря проведена в восточных районах моря. Первые данные о количественном распределении донных беспозвоночных в западной половине моря приведены Спэрком [8]. Им обработаны и опубликованы материалы, собранные датской океанографической экспедицией «Дана» у западного побережья Италии и в Алжирской бухте. Качественному составу и количественному распределению зообентоса западной половины Средиземного моря посвящены предварительные сообщения, сделанные на основании материалов, собранных на НИС «Академик А. Ковалевский» в 1970 и 1974 гг. [1, 3]. Однако в них приводятся лишь обобщенные данные по биотопам для всей изученной акватории. В литературе сведения по количественному развитию и трофическим группировкам зообентоса банок Альборанского моря нами не встречены.

Материалы по распределению зообентоса на банках Альборанского моря [западная часть Средиземного моря] получены во время двух рейсов на НИС «Академик А. Ковалевский» весной 1979 и осенью 1980 г. Исследованы следующие банки: Алидад, Альборан, Провансо и Трофиньо. Распределение станций по биотопам и глубинам представлено в табл. 1.

Количественные пробы отбирали дночерпателем «Океан» 0,25 м². Грунт промывали через систему сит. Два верхних сита с отверстиями диаметром 2 и 1 мм служили для улавливания организмов макрозообентоса. Выбранных из сит донных беспозвоночных взвешивали на весах ВДР-200 с точностью до 0,0001 г. Для сбора макрофауны использовали также бимтрал на жестких грунтах и трал Сигсби — на мягких. Коралловые рифы на банках затрудняли бентосные исследования, поэтому полученный на станциях материал ограничен восемью дночерпательными и пятью траловыми пробами (две неполноценные).

Для выяснения соотношения трофических группировок из каждого трала брали определенную часть улова. С этой целью использовали мерный кювет размером 40×40 см, высотой 2 см. Из пробы выбирали организмы макрофауны и взвешивали (особей одного вида всех вместе) с точностью до 0,0001 г. Донных беспозвоночных из тралового улова распределяли по группам, которые выделены на основании изучения (совместно с В. Д. Чухчиным) спектров питания и строения пищеварительного аппарата. Организмы макрозообентоса Альборанского моря