

ПРОВ 98

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
МОРСКОЙ ГИДРОФИЗИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

ПРОВ 2010

**ДИАГНОЗ СОСТОЯНИЯ СРЕДЫ
ПРИБРЕЖНЫХ И ШЕЛЬФОВЫХ ЗОН
ЧЕРНОГО МОРЯ**

Сборник научных трудов

Институт биологии
южных морей ТН УССР
БИБЛИОТЕКА
№ 38354

Севастополь
1996

Л.Л.Смирнова, Л.А.Георга-Копулос

ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МОРСКИХ ГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ К ДЕЙСТВИЮ "АКТИВНОГО" ХЛОРА

Чувствительность гетеротрофных бактерий к хроническому действию биоцида — "активный" хлор микрообрастания с доминированием диатомовых водорослей уменьшается. Методом ИК-спектроскопии показано, что в метаболитах ценоза, защищающегося от действия "активного" хлора концентрацией до 3,0 мг/л органические алифатические кислоты, их эфиры, моносахариды сменяются ароматическими структурами и полисахаридами, принимающими на себя защитную функцию.

Эффективность использования электролизного хлорирования морской воды для защиты от обрастания водоводов, циркуляционных систем тепловых и приливных электростанций отмечено в работах [1-4]. Защитная концентрация образующегося при этом "активного" хлора ($A_{\text{хл}}$) зависит от многих факторов, в том числе от сезона хлорпоглощаемости морской воды, концентрации и длительности воздействия хлорированной воды на гидробионты.

Чаще всего приходится защищать металлическую поверхность водоводов от нарастания слизистой пленки сообщества перифитонных микроорганизмов (СПМ). С этой целью предлагается использовать концентрации $A_{\text{хл}}$ от 0,5 до 50 мг/л [2,5]. Отрабатанная хлорированная морская вода обычно сбрасывается в море, загрязняя акваторию в районе сброса. Отмечено, что остаточная концентрация $A_{\text{хл}}$ 0,1–0,5 мг/л губительна для 30–80 % гетеротрофных бактерий планктона и перифитона [5]. Поэтому целесообразно при защите от обрастания $A_{\text{хл}}$ использовать минимально необходимую дозу этого биоцида, чтобы сбросовые воды не нарушали естественного состояния шельфовых морских экосистем.

Исследовано влияние сезонной динамики структуры микроперифитона и времени формирования этого ценоза на чувствительность гетеротрофных бактерий перифитона к кратковременному и хроническому действию различных концентраций $A_{\text{хл}}$. С помощью ИК-спектроскопии определена природа продуктов метаболизма ценоза в естественном и стрессовом состояниях. Изучены последствия действия низких концентраций $A_{\text{хл}}$ на планктонные гетеротрофные бактерии, определено время начала восстановления численности и активности этого важного звена морской экосистемы.

Материалы и методы. Для исследования использовали микрообрастание, полученное на стеклянных пластинах после 10, 20, 30, 40 сут экспонирования в море. По данным систематических наблюдений, проводимых в этом районе, в ценозе осенне-зимнего обрастания доминировали диатомовые водоросли, в ценозе весенне-летнего — бактерии [6].

Хлорированная морская вода из электролизеров постоянно подавалась в кристаллизаторы, куда устанавливались стеклянные пластины с микрообрастанием. Контрольные пластины находились в кристаллизаторах с проточной морской водой. Экспериментальные работы проводились в диапазоне концентраций $A_{\text{хл}}$ от 0,03 до 7,0 мг/л. Концентрация $A_{\text{хл}}$ определялась иодометрически [7]. Биохимическое потребление кислорода за 5 сут (БПК₅) определялось

в трех параллельных повторностях. Численность гетеротрофных бактерий планктона и перифитона учитывалась методом посевов [8].

Для снятия ИК-спектров получали хлороформенные экстракты продуктов метаболизма исследуемых ценозов. Пластинку с микрообрастанием после испытания в хлорированной или контрольной морской воде помещали в делительную воронку и проводили последовательно экстракцию тремя порциями хлороформа по 15, 10 и 5 мл в течение 2 мин каждую. Полученные экстракты отфильтровывали через отмытую в хлороформе и высушенную вату. Для съемки спектров использовались кюветы из бромистого калия. Толщина слоя исследуемого экстракта без растворителя определялась толщиной кольцевой прокладки из фольги (0,02 мм). В качестве основных параметров, характеризующих химическую природу метаболитов, приняты значения частот ИК полос поглощения, относящихся к основным функциональным и структурным группам молекул [9,10]. Для количественного сопоставления использованы значения оптических плотностей характеристических полос поглощения, приведенных в виде обратной величины к плотности полосы поглощения при 1460 см^{-1} [10]. Инфракрасные спектры снимались на приборе Specord-75 в диапазоне длин волн $4000\text{--}600\text{ см}^{-1}$.

Результаты и их обсуждение. Наблюдаемые количественные изменения численности гетеротрофных бактерий, как ответная реакция на действие $A_{\text{хл}}$, приведены в табл.1. Можно отметить, что чувствительность гетеротрофных бактерий перифитона к $A_{\text{хл}}$ зависит от времени формирования ценоза, концентрации и продолжительности действия биоцида.

При доминировании в микроперифитоне бактерий численность гетеротрофов равномерно уменьшается с возрастанием концентрации $A_{\text{хл}}$ и увеличением длительности действия этого реагента. Чем продолжительнее экспонирование стеклянных пластин в море (30, 40 сут), тем слабее действие $A_{\text{хл}}$ на гетеротрофные микроорганизмы. В силу своей высокой окислительной способности [9] часть биоцида расходуется на химическое взаимодействие с органическим веществом — продуктами жизнедеятельности СПМ. Обычно содержание органического вещества (ОВ) при доминировании в СПМ бактерий достигало 50–55 % в пересчете на сухую биомассу и зависело от времени экспонирования пластин в море. По химической природе ОВ представлено белком и углеводами [6]. Поэтому при 5-часовой обработке хлорированной морской водой, содержащей 0,4 мг/л $A_{\text{хл}}$ 40- и 10-суточных сообществ, во втором случае наблюдалась большая гибель бактерий (табл.1). Также большая гибель гетеротрофных клеток наблюдалась при хроническом действии $A_{\text{хл}}$ (85 ч) на 40 сут СПМ в диапазоне концентраций от 0,4 до 6,4 мг/л в сравнении с 24-часовым действием этого биоцида на то же сообщество при тех же концентрациях. Значит, с увеличением времени формирования ценоза растет устойчивость гетеротрофных микроорганизмов и их смертность определяется в этом случае концентрацией биоцида. Такая закономерность сохраняется и с увеличением видового разнообразия ценоза — появлением диатомовых водорослей.

Однако при доминировании в СПМ диатомовых водорослей чувствительность гетеротрофов к $A_{\text{хл}}$ имеет сложный характер. Сравнивая динамику гибели гетеротрофных бактерий в двух 20-суточных сообществах (первый вариант — доминируют бактерии, второй — диатомовые) можно подсчитать, что во втором случае при кратковременном (5 мин) действии низких концент-

Таблица 1

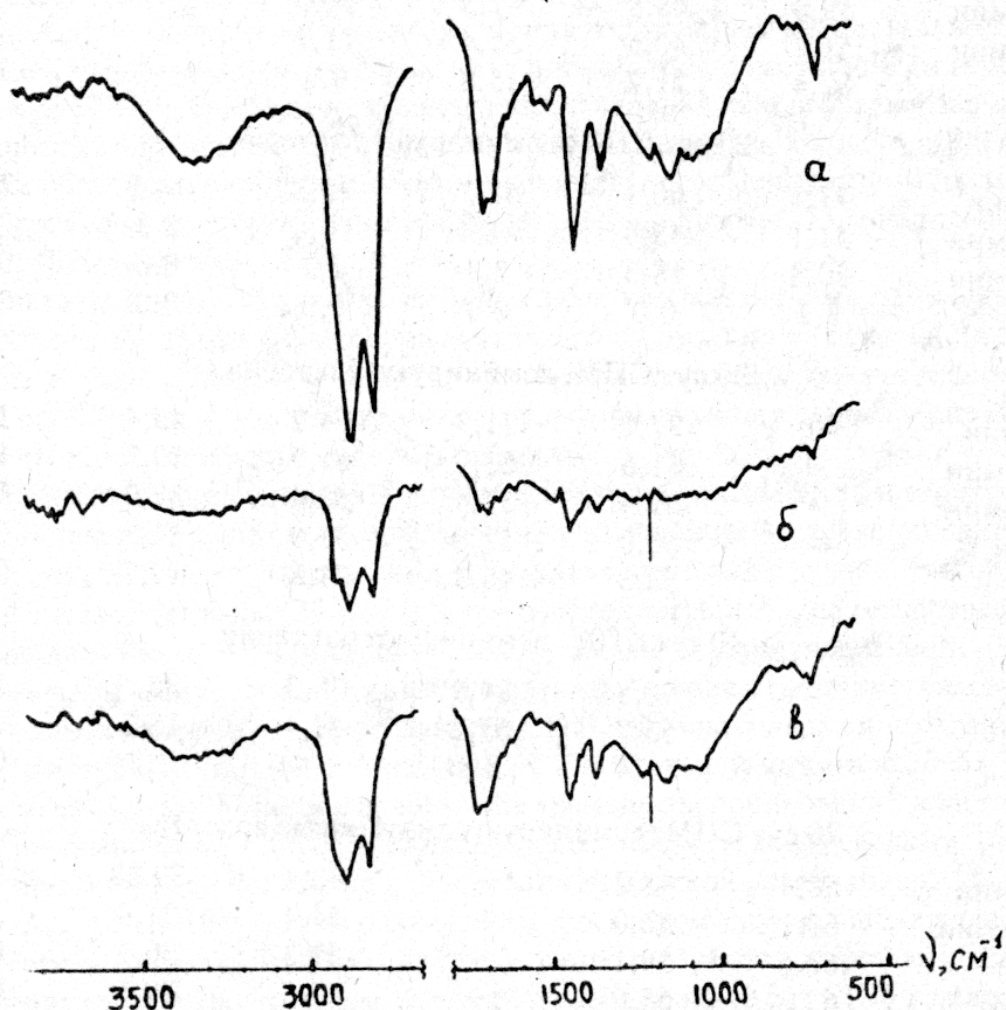
Влияние структуры и времени формирования СПМ на выживание гетеротрофных бактерий после действия $A_{\text{хл}}$ (% живых клеток к контролю)

Время действия биоцида	Концентрация $A_{\text{хл}}$, мг/л					
	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4
10 сут СПМ, доминируют бактерии						
5 мин	71,2	56,2	48,3	32,1	—	—
20 мин	59,8	45,8	42,3	20,0	—	—
80 мин	51,2	40,6	35,4	11,7	—	—
5 ч	32,4	21,2	15,8	9,2	—	—
20 сут СПМ, доминируют бактерии						
5 мин	77,1	60,1	48,7	35,2	14,0	2,4
20 мин	51,1	45,6	21,4	10,4	3,3	0,0
80 мин	30,9	18,3	7,3	3,7	0,0	0,0
5 ч	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
30 сут СПМ, доминируют бактерии						
5 мин	—	87,1	71,3	64,2	45,4	1,6
20 мин	—	81,6	63,9	61,7	39,2	1,3
80 мин	—	61,4	57,4	53,4	37,0	0,0
5 ч	—	60,0	52,8	51,9	26,3	0,0
24 ч	—	53,3	46,8	31,8	19,7	0,0
40 сут СПМ, доминируют бактерии						
5 ч	—	90,5	84,9	78,3	36,5	1,0
24 ч	—	65,7	57,2	43,4	13,2	0,0
85 ч	—	11,4	2,8	1,4	1,2	0,0
20 сут СПМ, доминируют диатомовые водоросли						
5 мин	58,4	45,2	—	40,4	30,88	2,0
80 мин	60,1	52,0	—	54,4	31,4	1,5
5 ч	62,6	59,1	—	51,3	30,1	0,0
24 ч	63,3	65,6	—	47,3	29,1	0,0
30 сут СПМ, доминируют диатомовые водоросли						
5 мин	70,3	66,8	—	49,5	32,7	1,2
80 мин	55,6	60,7	—	46,4	32,2	0,0
5 ч	60,8	63,2	—	54,1	28,3	0,0
24 ч	66,2	76,9	—	73,2	31,5	0,0

раций $A_{\text{хл}}$ (до 1,5 мг/л) смертность гетеротрофных клеток выше. Бактерии угнетены не только $A_{\text{хл}}$, но и метаболитами интенсивно развивающихся диатомовых [6]. Хроническое действие $A_{\text{хл}}$ вызывает быструю ответную защитную

реакцию всего сообщества, обеспечивающую повышение к нему устойчивости клеток гетеротрофных бактерий (табл.1). Уменьшение чувствительности гетеротрофов к биоциду происходит не за счет увеличения количества органических метаболитов СПМ (в осенне-зимний сезон содержание ОВ в микроперифитоне всего 25–30% в пересчете на сухую биомассу [6]), а за счет изменения характера метаболизма. Что можно наблюдать на ИК-спектрах продуктов метаболизма СПМ после хронического действия $A_{хл}$ (рисунок).

Обычно при небольшом количестве ароматических кислот, эфиров и хиноидных структур (области поглощения $1650, 1255\text{ см}^{-1}$) в продуктах жизнедеятельности СПМ преобладают алифатические органические соединения, интенсивное поглощение длинных парафиновых цепочек (720 см^{-1}). В основ-



ИК-спектры продуктов метаболизма 20-суточных СПМ с доминированием диатомовых водорослей в естественном состоянии (а), после обработки $A_{хл}$ концентрацией 0,12 мг/л (б) и 3,20 мг/л (в)

ном это органические кислоты, их сложные эфиры (поглощение в областях $1700, 1720, 1120\text{ см}^{-1}$) и углеводы (моносахара), что подтверждается присутствием кетонных, альдегидных и гидроксильных групп ($3400\text{--}3200\text{ см}^{-1}$) (рисунок, а).

На ИК-спектрах ценоза, защищающегося от действия биоцида (рисунок, б), на фоне уменьшения содержания метановых, кислородсодержащих групп ($1720, 1680\text{ см}^{-1}$) появляются циклические структуры, увеличивается поглощение в области простых эфирных связей, что, по-видимому, связано с продуцированием защитных олиго- и полисахаридов. Кроме того, в продуктах

метаболизма увеличивается содержание ароматических структур (1250, 1170, 1070 см^{-1}).

При обработке микроперифитона более концентрированными растворами $A_{\text{хл}}$ на ИК-спектрах (рисунок, в) выявляется специфический окислительный характер действия биоцида. Более чем в 1,5 раза возрастает содержание кислородсодержащих соединений (поглощение в областях 1720–1680 см^{-1}), в 1,3 раза падает содержание длинных парафиновых цепей (720 см^{-1}), увеличивается количество коротких боковых цепей (1380 см^{-1}). Следовательно, продукты метаболизма микроперифитона подвергаются интенсивной окислительной деструкции. При визуальном осмотре пластин после испытания в морской воде, содержащей $A_{\text{хл}}$ концентрацией выше 5,0 мг/л, наблюдалось обесцвечивание слоя микрообрастания.

Ранее была отмечена высокая чувствительность гетеротрофных бактерий планктона к действию $A_{\text{хл}}$ [5]. При обработке морской воды (с исходным содержанием гетеротрофных клеток $2-3 \cdot 10^6$ кл/мл) $A_{\text{хл}}$ концентрацией 0,3 мг/л наступает ее полная стерилизация. Динамика гибели бактериопланктона после хлорирования морской воды низкими концентрациями $A_{\text{хл}}$ (до 0,1 мг/л) изучалось при ее отстаивании в течение суток. Одновременно определялись численность гетеротрофных бактерий и БПК₅ контрольной необработанной $A_{\text{хл}}$ морской воды. Полученные результаты приведены в табл. 2.

После прекращения действия $A_{\text{хл}}$ в течение первого часа отстаивания продолжалась гибель оставшихся в живых бактериальных клеток. По-видимому, одной из причин высокой токсичности морской воды являются не только обладающие окислительной способностью составляющие $A_{\text{хл}}$: гипохлорит-ион, хлорит-ион, которые распадаются в течение 2 мин [11], но и более стабильные

Таблица 2

Характеристика гетеротрофной микрофлоры морской воды
после обработки $A_{\text{хл}}$ (0,06 мг/л)

Время отстаивания морской воды, ч	Живые клетки (% к контролю)	БПК ₅ (% к контролю)
Сразу после обработки	73,9	7,0
0,3	59,6	11,0
0,5	40,3	10,0
1,0	38,5	13,0
18,0	40,0	15,5
20,0	44,1	14,0
24,0	69,0	38,5

продукты взаимодействия $A_{\text{хл}}$ с компонентами морской воды [12]. Поэтому наблюдаемая гибель гетеротрофных бактерий может происходить под действием этих более стабильных и токсичных соединений. После 15–20 ч отстаивания морской воды процесс гибели бактерий замедлялся, за этот же период незначительно увеличилось БПК₅ (табл. 2). И только после 24 ч отстаивания начинался стабильный прирост бактериальных клеток с одновременным возрастанием

величины БПК₅. Наблюдаемый процесс восстановления численности и активности гетеротрофных микроорганизмов после прекращения действия $A_{хл}$ очень важен для восстановления функциональной роли бактерий в морской экосистеме.

Выводы и предложения.

1. Экспериментально показано, что время формирования СПМ определяет защитные концентрации $A_{хл}$. При кратковременном действии биоцида (концентрация до 1,5 мг/л) чувствительность гетеротрофных микроорганизмов в СПМ с доминированием бактерий к нему ниже, чем в СПМ с доминированием диатомовых водорослей. При хроническом действии поллютанта их чувствительность уменьшается с увеличением видового разнообразия ценоза.

2. Методом ИК-спектроскопии показано, что в метаболитах СПМ, образующихся в условиях действия на сообщества $A_{хл}$ (концентрациями до 3,0 мг/л), органические алифатические кислоты, их эфиры, моносахариды сменяются на принимающих на себя защитную функцию ароматические структуры и полисахариды. При действии на СПМ более высоких концентраций биоцида наблюдается окислительная деструкция органического вещества.

3. Остаточная концентрация $A_{хл}$ в сбрасываемой в море хлорированной морской воде не должна превышать величину 0,1–0,2 мг/л. Такой диапазон концентраций можно поддерживать, разбавляя сбросовые воды порциями чистой морской воды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гуревич Е.С., Нехорошев И.Н. Защита от коррозии и обрастания конструкций Кисловодской ПЭС // Гидротехн. строит. — 1974. — N2. — С.26–28.
2. Джалилов Р.К., Караева Н.И., Магеррамова Н.Г. Состав биоценоза обрастания систем оборотного водоснабжения двух перерабатывающих предприятий и эффективность хлорирования для борьбы с ним // Биокоррозия, биоповреждение, обрастание. — 1971. — N2. — С.96–102.
3. Якубенко А.Р., Люблинский Е.Я., Белоиваненко В.И. и др. Физико-химическая защита от обрастания в судостроении // Судостроение. — 1983. — N1. — С.33–35.
4. Якубенко А.Р., Щербакова И.Б., Якубенко Л.А. Критерии и технологические параметры защиты от обрастания электролизным хлорированием систем морской воды // Технология судостр. — 1981. — N10. — С.120–123.
5. Шадрин Л.А., Горбенко Ю.А., Ковальчук Ю.Л. Влияние активного хлора на сообщество перифитонных микроорганизмов // Депон.рукопись N198-B87. — М.: ВИНТИ, 1987. — 13 с.
6. Бобкова А.Н. Сезонные изменения структуры биохимического состава микроперифитона // Гидробиол. журн. — 1990. — 26, N2. — С.33–37.
7. Унифицированные методы анализа вод / Под ред. Лурье Ю.Ю. — М.: Химия, 1973. — 376 с.
8. Горбенко Ю.А. Экология морских микроорганизмов перифитона. — Л.: Наука, 1977. — 252 с.
9. Беллами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул. — М.: Иностран. литература, 1963. — 590 с.
10. Глебовская Е.А. Применение ИК-спектроскопии в нефтяной геохимии. — М.: Недра, 1971. — 135 с.
11. Щербакова И.Б., Жук А.П., Кутузова Л.И. Исследование хлорпоглощаемости морской воды // Судостр. промышленность. Серия Судоверфь. Технология и организация производства. — 1987. — 6. — С.66–67.
12. Георга-Копулос Л.А., Смирнова Л.Л. Тестирование морской воды после электролизного хлорирования методом ИК-спектроскопии // Тез. докл. Всесоюз. школы по техн. средствам и методам освоения океана. (Институт океанологии им. П.П. Ширшова) — М.: Недра, 1991. — 2. — С.123–124.
13. Фрумина Н.С., Лисинко Н.Ф., Чернова М.А. Сл. — М.: Наука, 1983. — 197 с.

Институт биологии южных морей НАН Украины,
г. Севастополь