

5774
940

ISSN 0203-4646

ЭКОЛОГИЯ МОРЯ

1871



9

1982

SEASONAL DYNAMICS OF BACTERIOPLANKTON RESPIRATION INTENSITY IN THE SEVASTOPOL BAY

Summary

Maximum bacterial oxygen consumption is registered in the bay in March. The mean respiration rate of bacterial cells at 20°C was $0.36 \cdot 10^{-9}$ mg O₂/cell/day (varying from $0.16 \cdot 10^{-9}$ to $1.21 \cdot 10^{-9}$ mg O₂/cell/day). In March bacteria possessed the highest mineralizing activity. A temperature rise in situ, an increase in the organic matter content, in water contributed to bacterial destruction intensification. Bacterial biosynthesis efficiency in the bay was 25%.

УДК 576.8.095:547.458

В. Л. БАЗЕЛЯН, В. В. ГУБАНОВ, Р. П. КАНДЮК

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТВОРЕННЫХ В МОРСКОЙ ВОДЕ ПОЛИСАХАРИДОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ

Содержание растворимых углеводов в прибрежной зоне моря равно 1—2, иногда до 8 мг/л [15, 16].

Исследованиями некоторых авторов [10] показано, что внешнеметаболический комплекс РОВ представляет собой сбалансированную биохимическую систему. Имеются основания предполагать, что поступающие высокомолекулярные соединения РОВ в составе прижизненных и посмертных выделений водорослей и бактерий в значительной мере превращаются благодаря ферментативным процессам.

Свидетельством внеклеточных ферментативных превращений различных классов полисахаридов, протекающих в морской среде и связанных с деятельностью микрофлоры, может служить прямое определение амилалитической активности морской и пресной воды [3, 4, 14]. По данным А. Е. Крисса [5], способность гидролизовать крахмал среди морских микроорганизмов чаще всего встречается у актиномицетов и неспороносных палочек, значительно реже — у кокковых форм. Кроме того, амилалитическая активность гетеротрофных микроорганизмов из различных морей и районов Мирового океана, а также в разные сезоны года отличается существенно (табл. 1).

Однако данные о физиологической активности морских бактерий, полученные при изучении на бактериологических питательных средах, могут дать лишь отдаленное представление о роли этих бактерий в трансформации растворенных полисахаридов в морской воде. Применение радиоуглеродного метода позволяет качественно изучить трансформацию различных макромолекул и получить количественные характеристики данного процесса. В этой связи целью нашей работы явилось изучение скорости трансформации растворимых ¹⁴C-полисахаридов под действием культуры амилалитических бактерий, выделенной из воды Черного моря.

Материалы и методы. Водорастворимые ¹⁴C-полисахариды с молекулярной массой ≥ 50000 выделяли из талломов *Enteromorpha linza* (L.) J. Ag. (Черное море) по описанной ранее методике [2].

Выделение культуры бактерий, обладающей амилалитической активностью. Бактерии были выделены на среде с растворимым крахмалом, приготовленной на морской воде. Амилалитическую активность определяли по отсутствию зоны окрашивания (йодной пробы) вокруг колоний микроорганизмов. Из шести изолированных таким образом культур амилалитических бактерий отобрали наиболее активную, отнесенную при дальнейшей идентификации к роду *Pseudomonas*.

Таблица 1. Сравнительные данные об амилалитической активности гетеротрофных микроорганизмов, выделенных из различных морей и районов Мирового океана

Моря и районы Мирового океана	Культуры, гидролизующие крахмал, %	Автор
Черное море	35,2	А. Е. Крисс [5]
Черное море, северо-западная часть	11,1 (весна) 11,0 (лето) 13,6 (осень) 61,6 (зима)	А. В. Цыбань [12]
Азовское море	35,6 (бактериопланктон)	А. В. Цыбань [13]
Средиземное море	51,8 (бактерионейстон) 30,3	М. Н. Лебедева, Е. М. Маркианович [8, 9]
Красное море и Аденский залив	60,3	А. Е. Крисс и др. [7]
Атлантический океан (20—40°)	77,6	" "
Индийский океан	89,5	" "
Мировой океан (23—40°)	72,1	" "
Мировой океан (10—23°)	80,5	" "
Тихий океан	71,0	А. Е. Крисс и др. [6]
Индийский океан и моря Антарктики	72,7	" "
Атлантический океан, Гренландское и Норвежское моря, Центральная Арктика	96,7	" "

Культура амилалитических бактерий, использованная в опытах, была выделена из морской воды прибрежной зоны Одесского залива в январе 1978 г. (опыты проводились в феврале — марте этого же года).

Гидролиз ^{14}C -полисахаридов под действием амилалитических бактерий. В опытах использовали 48-часовую культуру *Pseudomonas* sp., выращенную на среде с крахмалом, которую приготавливали на морской воде. Количество микроорганизмов, внесенное в пробу, определяли по оптической плотности и проверяли «чашечным методом». В течение всего опыта контролировали изменение количества микроорганизмов в инкубационной среде. Концентрация полисахаридов во всех опытах составляла 4 мг/л, температура — 20°C, время гидролиза — 1, 2, 4 и 6 сут. Гидролиз прерывали добавлением охлажденной трихлоруксусной кислоты (ТХУ), нескольких капель толуола и последующим отделением микроорганизмов от инкубационной среды центрифугированием при 10000 об/мин и 0°C. Надосадочную жидкость сливали и использовали для дальнейшего фракционирования. Осадок микроорганизмов суспендировали и определяли количество сорбированных полисахаридов по остаточной радиоактивности. Одновременно ставилась контрольная проба без добавления микроорганизмов.

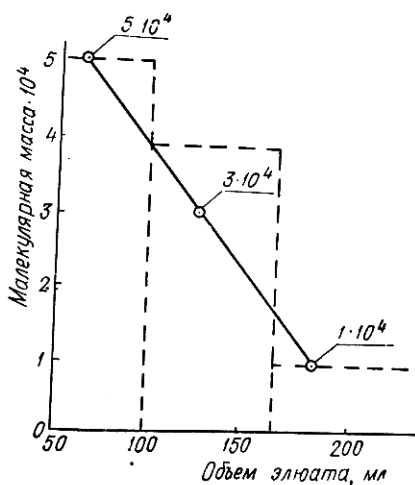


Рис. 1. Калибровочная кривая для колонки с гелем Г-75.

Пунктирной линией обозначены границы выхода полисахаридов определенной молекулярной массы.

Таблица 2. Превращение растворенных в морской воде ^{14}C -полисахаридов

Показатель	Единица измерения	Время			
		Первые		Вторые	
		Контроль	Опыт	Контроль	
Молекулярная масса полисахаридов $\geq 5 \cdot 10^4$ **	имп/мин	8363 $\pm$ 734	6171 $\pm$ 518	8143 $\pm$ 697	
	%	99,8 $\pm$ 8,7	73,6 $\pm$ 6,2	99,1 $\pm$ 8,5	
	мг/л	3,990 $\pm$ 0,350	2,944 $\pm$ 0,247	3,963 $\pm$ 0,339	
$\geq 3 \cdot 10^4$	имп/мин	21 $\pm$ 6	232 $\pm$ 30	76 $\pm$ 12	
	%	0,3 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,1	
	мг/л	0,010 $\pm$ 0,003	0,111 $\pm$ 0,14	0,037 $\pm$ 0,006	
$< 3 \cdot 10^4$	имп/мин	0	501 $\pm$ 47	0	
	%	0	5,98 $\pm$ 0,6	0	
	мг/л	0	0,239 $\pm$ 0,022	0	
Сорбировано полисахаридов бактериями	имп/мин	0	162 $\pm$ 20	0	
	%	0	1,9 $\pm$ 0,2	0	
	мг/л	0	0,077 $\pm$ 0,009	0	
Превращено полисахаридов до CO_2	имп/мин	0	1318 $\pm$ 110	0	
	%	0	15,7 $\pm$ 1,3	0	
	мг/л	0	0,629 $\pm$ 0,052	0	

*Превращенными считались полисахариды с молекулярной массой $< 5 \cdot 10^4$.

** Количество нетрансформированных полисахаридов.

Фракционирование гидролизата ^{14}C -полисахаридов. На колонку с нейтральным сефадексом Г-75 (h -50 и d -2,3 см) наносили по 5 мл гидролизата. Элюировали дистиллированной водой, собирая фракции по 5 мл. Колонка предварительно была проградуирована по молекулярным массам (рис. 1) полисахаридами известной молекулярной массы, полученными на установке «Амикон» методом ультрафильтрации [2].

Радиометрию элюата и суспензии микроорганизмов вели на жидкостном сцинтилляционном счетчике Изокап-300 фирмы «Нуклеар Чикаго» в сцинтилляторе Брэя. Во флакон, содержащий 10 мл сцинтиллятора, вносили по 1 мл элюата.

Результаты и обсуждение. Микроорганизмы морской воды играют важнейшую роль в процессах превращения органических веществ, в том числе и РОВ. Обладая уникальными ферментными системами, они являются основными регуляторами скорости трансформации различных типов полисахаридов в морской воде. Скорость гидролиза определяется особенностями строения конкретного соединения. При этом более доступные соединения, например крахмалоподобные вещества, разлагаются не только быстрее, но и большим количеством видов водной микрофлоры. Другие соединения — хитин, гемицеллюлозы — разлагаются медленнее и меньшим количеством микробных форм. Очевидно, скорость гидролиза и время обновления этих соединений в морской среде различны. Некоторыми исследователями были предприняты попытки оценить роль микроорганизмов в этих процессах [1, 11].

Интерпретация результатов лабораторных опытов по изучению трансформации различных соединений микроорганизмами осложнена тем, что в большинстве случаев эти эксперименты ставятся в сосудах с ограниченным объектом, т. е. в «закрытых системах». Другим осложняющим фактором является некоторое ускорение процесса трансформации благодаря адсорбции полисахаридов на стенках колб [7]. Однако постановка контрольных проб позволила учесть количество гидролизованных полисахаридов в результате пристеночного эффекта.

под действием амилолитических бактерий *

гидролиза, сут

Опыт	Четвертые		Шестые	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
5473±432 66,6±5,3 2,664±0,210	8182±916 98,5±11,0 3,938±0,441	4173±374 50,2±4,5 2,009±0,180	8274±681 98,3±8,1 3,933±0,324	3240±287 38,5±3,4 1,540±0,136
65±10 0,8±0,1 0,032±0,005	128±18 1,5±0,2 0,062±0,009	344±29 4,1±0,3 0,166±0,014	142±21 1,7±0,2 0,067±0,010	4±2 0,05±0,02 0,002±0,001
336±30 4,1±0,4 0,163±0,014	0 0 0	869±63 10,5±0,8 0,418±0,030	0 0 0	1722±106 20,5±1,3 0,818±0,050
287±26 3,5±0,3 0,139±0,013	0 0 0	393±49 4,7±0,6 0,189±0,023	0 0 0	527±56 6,3±0,7 0,251±0,027
2058±202 25,0±2,5 1,002±0,098	0 0 0	2531±214 30,5±2,6 1,218±0,103	0 0 0	2923±207 34,7±2,5 1,389±0,098

В наших опытах была использована стерилизованная фильтрацией морская вода с добавлением меченых полисахаридов в количестве, немного превышающем их содержание в прибрежных зонах моря. Количество микроорганизмов несколько превышало обычную их численность в незагрязненных акваториях и возрастало в течение опыта. Поэтому естественно, что скорость гидролиза полисахаридов в условиях ограниченного объема воды в колбах отличается от природной. Более того, мы использовали чистую культуру бактерий, а в морской воде, как известно, трансформация полисахаридов проходит одновременно под воздействием нескольких видов микроорганизмов, продуцирующих ферменты, которые могут атаковать различные типы химических связей. Несмотря на ряд недостатков, постановка таких экспериментов дает возможность показать способность микроорганизмов трансформировать те или иные соединения, получить количественные данные, характеризующие этот процесс, и изучить влияние различных экологических факторов: температуры, солености, солнечной радиации, загрязнений и др.

Полисахариды гидролизуются под действием внеклеточных и поверхностно локализованных бактериальных ферментов, о чем свидетельствуют полученные нами данные (табл. 2). Механизм гидролиза полисахаридов при контакте с микроорганизмами состоит из сорбции субстрата (полисахаридов) на поверхности бактерий, взаимодействия субстрата с энзимами микроорганизмов, десорбции низкомолекулярных продуктов и частичного усвоения низкомолекулярных осколков бактериями [1]. Кроме того, часть выделенных микроорганизмами ферментов поступает в окружающую воду, где также происходит гидролиз растворенных веществ, однако значительно медленнее, чем на поверхности бактериальных клеток, так как концентрация ферментов в морской воде намного меньше таковой на поверхности бактерий.

Из табл. 2 следует, что в условиях опыта наиболее интенсивно пре-
вращаются полисахариды в течение первых суток, тогда скорость гид-

ролиза составляет 1046, а за вторые — 650 мкг/л. Затем интенсивность гидролитических процессов еще больше замедляется, составляя соответственно 482 и 399 мкг/л на четвертые и шестые сутки. Исходное количество бактерий составляло $6 \cdot 10^4$ кл/мл, на конец первых, вторых, четвертых и шестых суток — соответственно $1,6 \cdot 10^5$, $5,25 \cdot 10^5$, $4,48 \cdot 10^5$ и $1,34 \cdot 10^5$ кл/мл. Уменьшение скорости гидролиза в последующие сутки,

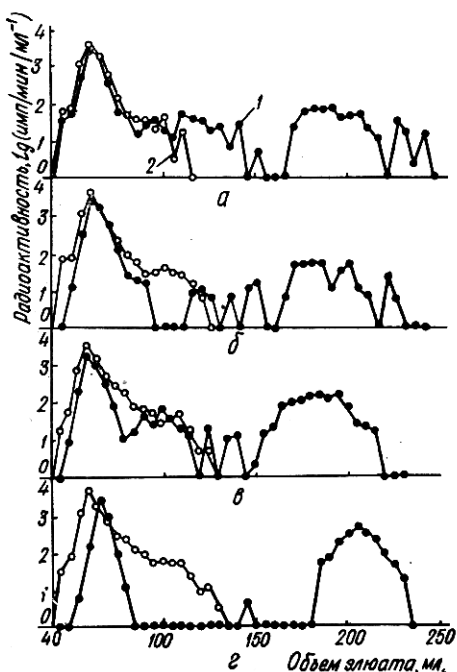


Рис. 2. Распределение ^{14}C -полисахаридов с $\text{MM} \geq 5 \cdot 10^4$ после их взаимодействия с амилалитическими бактериями в морской воде за первые сутки (а), вторые (б), четвертые (в) и шестые (г) сутки:

1 — контроль; 2 — опыт.

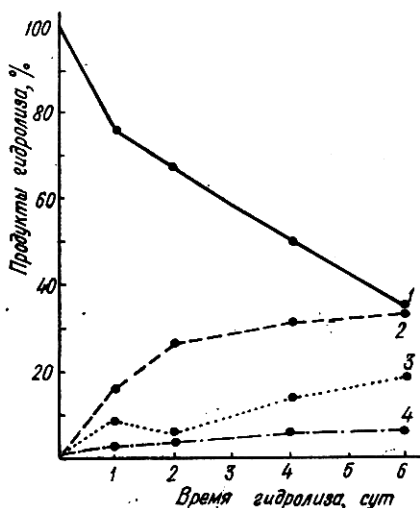


Рис. 3. Деградация и распределение ^{14}C -полисахаридов с $\text{MM} \geq 5 \cdot 10^4$ на колонке с гелем Г-75 после контактного взаимодействия с амилалитическими бактериями в морской воде:

1 — полисахариды с $\text{MM} \geq 5 \cdot 10^4$ (негидролизованный остаток); 2 — превращено до CO_2 ; 3 — фракция полисахаридов с $\text{MM} < 50\,000$ (продукты гидролиза); 4 — сорбировано бактериями.

вероятно, обусловлено снижением концентрации полисахаридов, а также наличием токсических продуктов, ингибирующих ферментативный процесс.

Интересно отметить, что на шестые сутки отсутствуют полисахариды среднемoleкулярной фракции с молекулярной массой (MM) $\geq 30\,000$ (рис. 2, г). В это же время сокращается численность бактериальных клеток, в результате лизиса которых во внешнюю среду выходят ферменты, гидролизующая доступную для атаки ферментов среднемoleкулярную фракцию. Как видно из рис. 2, с увеличением времени гидролиза пик радиоактивности полисахаридов смещается в сторону уменьшения молекулярной массы. Из данных табл. 2 и рис. 2 можно предположить, что лимитирующей стадией гидролиза полисахаридов является скорость образования среднемoleкулярной фракции. Это свидетельствует о том, что не все связи данного полисахарида подвергаются воздействию продуцируемых бактериями ферментов.

Результирующий график (рис. 3) процесса трансформации полисахаридов показывает, что превращение продуктов гидролиза до углекислоты идет в первые двое суток наиболее интенсивно (выделение углекислоты рассчитано по разнице суммарной радиоактивности контрольной и опытной проб). Затем жизнедеятельность микроорганизмов

снижается, вероятно, из-за накопившихся токсических продуктов, и кривая, характеризующая этот процесс, идет почти параллельно оси ординат. Скорость гидролиза полисахаридов также равномерно уменьшается, но наклон кривой (рис. 3, 3) показывает, что этот процесс осуществляется, по-видимому, за счет внеклеточных ферментов лизировавших бактерий, поскольку выделение углекислоты в этот период резко снижается.

Характер наклона кривой 4 на рис. 3 показывает, что с увеличением времени количество адсорбированных бактериями полисахаридов равномерно повышается, тогда как количество клеток на четвертые и шестые сутки уменьшается. Однако эти данные не противоречивы: при подсчете «чашечным» методом учтено количество только живых бактериальных клеток, образующих колонии, а величина адсорбции полисахаридов включает и количество адсорбированных полисахаридов уже отмершими бактериями.

Таким образом, внеклеточные ферменты микроорганизмов участвуют в превращении РОВ и влияют на скорость обновления отдельных классов биополимеров. Однако проявление активности внеклеточных ферментов зависит от целого ряда экологических факторов, поэтому скорость ферментативного превращения РОВ будет различной в отдельных точках. Лимитирующими факторами скорости превращения растворимых биополимеров в открытых системах, кроме температуры, солености, солнечной радиации, загрязнений, гидростатического давления и др., являются доступность химических связей для атаки ферментами и концентрация веществ (субстрата).

1. Айзатуллин Т. А., Хайлов К. М. Кинетика трансформации белков и полисахаридов, растворенных в морской воде, при взаимодействии с детритом. — Океанология, 1972, 12, вып. 5, с. 809—816.
2. Базелян В. Л., Шафажинская Н. Е. Ферментативный гидролиз полисахаридов в морской воде и при контакте со взвешенными частицами. — Биология моря, Киев, 1979, вып. 51, с. 92—102.
3. Батурина М. В. Растворенное органическое вещество и его корпускулярные компоненты в водах экваториальной зоны Тихого океана: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1977. — 24 с.
4. Грибаускене В. Ю., Ямонтене М. М., Янкявичюс К. К. Активность гидролитических ферментов в воде и биомассе планктонических организмов эвтрофного водоема — залива Куршю Марес. — Тр. АН ЛитССР, Сер. В, 1973, 2, с. 3—7.
5. Крисс А. Е. Морская микробиология (глубоководная). — М.: Изд-во АН СССР, 1959. — 456 с.
6. Крисс А. Е., Мишустина И. Е., Земцова Э. В. Биохимическая активность гетеротрофных микроорганизмов, выделенных из различных областей Мирового океана. — Микробиология, 1962, 31, вып. 2, с. 314—323.
7. Крисс А. Е., Мишустина И. Е., Мицкевич И. Н., Земцова Э. В. Микробное население Мирового океана. — М.: Наука, 1964, — 298 с.
8. Лебедева М. Н., Маркианович Е. М. Распределение гетеротрофных микроорганизмов в Красном море и Аденском заливе. — Гидробиол. журн., 1965, 3, № 3, с. 24—31.
9. Лебедева М. Н., Маркианович Е. М. Распределение микроорганизмов различной видовой принадлежности в морях Средиземноморского бассейна. — В кн.: Планктон морей Средиземноморского бассейна. — М.: Изд-во АН СССР, 1965, с. 41—83.
10. Хайлов К. М., Горбенко Ю. А. Внешнеметаболическая регуляция в системе сообщество перифитонных микроорганизмов — растворенное органическое вещество морской воды. — Докл. АН СССР 1967, 193, № 6, с. 1434—1437.
11. Хайлов К. М. Микробиологические процессы внеклеточного гидролиза полисахаридов, растворенных в морской воде. — Микробиология, 1968, 37, вып. 3, с. 518—522.
12. Цыбань А. В. Бактерионейстон и бактериопланктон шельфовой области Черного моря. — Киев: Наук. думка, 1970. — 276 с.
13. Цыбань А. В., Домчинская Т. В. Сапрофитная микрофлора Азовского моря. — Гидробиол. журн., 1974, 10, № 4, с. 5—13.
14. Янкявичюс К. К., Антанинене А. С., Баранаускаене А. Ю. и др. Экзогенные органические соединения планктонических организмов пресноводной экосистемы и их роль в развитии популяций. — В кн.: Тез. докл. Междунар. симпоз. «Взаимодействие между водой и живым веществом». Одесса, 6—10 окт. 1975. Севастополь, 1975, с. 31—33.

15. Collier A., Ray S. M., Magnitsky W. Preliminary note on naturally occurring organic substances in sea water, affecting the feeding of oyster. — Science, 1950, 111, N 2876, p. 151—158.
16. Walsh G. E. Studies of dissolved carbohydrates in cope cod waters. 1. General survey. — Limnol. and Oceanogr., 1965, 10, N 6, p. 570—576.

Институт биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского АН УССР

Поступила в редколлегию
19.11.79

Одесский государственный универси-
тет им. И. И. Мечникова

V. L. BAZELYAN, V. V. GUBANOV, R. P. KANDYUK
**STUDIES IN PROCESSES OF EXTRACELLULAR TRANSFORMATION
OF POLYSACCHARIDES DISSOLVED
IN SEA WATER CAUSED BY AMYLOLYTIC BACTERIA**

Summary

Enzymic systems of microorganisms participate in transformation of soluble polysaccharides converting them into a form suitable for other organisms' nutrition. Limiting factors of the soluble polysaccharide transformation rate in a closed system are as follows: 1) metabolic products excreted by microorganisms and inhibiting the enzymatic process, 2) availability of chemical bonds for enzyme attacking particular polysaccharides, 3) their concentration.

УДК 578.087.1

Н. Ю. МИЛОВИДОВА, Л. Н. КИРЮХИНА

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДОННЫХ ОСАДКОВ
И МАКРОЗООБЕНТОС
У ЮГО-ЗАПАДНОГО ПОБЕРЕЖЬЯ КРЫМА**

Неотъемлемой частью мероприятий по охране морской среды является систематический контроль за ее состоянием.

У юго-западного побережья Крыма детальные исследования качественного состава бентоса проводились в начале нынешнего века С. А. Зерновым [2]. Позже изучались свойства донных осадков Д. М. Раузер-Черноусовой [9], которая указала на источники и условия накопления органического вещества в бухте. Обнаружилось преобладание редуционных процессов над окислительными в вершинах бухт и значительно лучшие окислительные условия в их устьях, в крупнозернистых донных осадках и на положительных формах рельефа дна. Высокое содержание органического вещества в донных осадках рассматриваемых нами бухт отмечалось также в работах О. Г. Миронова [6], Н. Н. Алфимова и О. Г. Миронова [1].

Систематический контроль над состоянием донных осадков и макрозообентосом у юго-западного Крыма начат нами в 1973 г. и проводится с периодичностью через три года. По материалам 1973 г. описаны изменения донных биоценозов, происшедшие после исследований С. А. Зернова [4], и сделан статистический анализ зависимости распространения донных организмов от ряда параметров среды [8]. Кроме того, опубликованы материалы подводных исследований макрозообентоса крупнозернистых донных осадков фитали юго-западного Крыма [5].

Количественное описание мягких донных осадков и населяющего их макрозообентоса региона юго-западного Крыма ранее не проводилось и входит в задачу настоящей работы.

Материал и методы. Бентосные съемки проводили в бухтах, в прилежащей к бухтам части моря и у открытого побережья севернее бухт на 2,5 мили до глубины 30 м по однотипной сетке станций в 1973, 1976