

УДК 579:574.587(262.5)

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ БЕНТОСНЫХ БАКТЕРИЙ В ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЯХ КАРАДАГА И ДВУЯКОРНОЙ БУХТЫ (ЧЕРНОЕ МОРЕ)

Чекалов В.П.

ФГБУН «Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН»,
г. Севастополь, Российская Федерация, e-mail: valch@mail.ru

Рассмотрено влияние бактериобентосного сообщества на формирование кислородного режима и процессы деструкции органического вещества в зависимости от температуры и редокс условий в придонных системах рыхлых грунтов сопредельных акваторий в районе Карадага (Черное море). Жесткие условия среды в заглубленных донных осадках определяют значительное снижение окислительной активности и численности жизнедеятельной микрофлоры, несмотря на их более высокий деструкционный потенциал при оптимизации условий. Способностью к росту обладала лишь одна из ста клеток активных форм, и каждая пятнадцатая от возможного максимума численности при оптимальной температуре. При этом скорость окисления органических веществ в донных осадках у м. Мальчин при реальных условиях не превышала 1.19 мкг/г·ч, тогда как в мелководных грунтах Двужкорной бухты составлял 1.82 мкг/г·ч. Приведены данные о соотношении темпов окисления и продуцирования восстановленных соединений в донных осадках исследуемых районов.

Ключевые слова: донные отложения; потребление кислорода; бактериобентос; Чёрное море.

Введение

Несмотря на достаточно интенсивные исследования в акватории Карадагского заповедника, практически нет сведений о темпах окислительных процессов в донных осадках. Имеющиеся данные относятся преимущественно к водной среде. Отмечается, что содержание кислорода в узкой прибрежной зоне изменяется в пределах 5.14–7.96 мл О₂/л (или 7.34–11.37 мг О₂/л) при насыщении 96–118 %. Минимальное значение было зафиксировано на глубине 10 м у мыса Мальчин. (Ковригина, Бобко, Смирнова, 2005). Приведены также колебания в весенне-летний период значений БПК₅ в диапазоне 0.94–1.93 мг/л весной, 0.82–1.60 мг/л в летний период и 0.03–0.99 осенью (Ковригина и др., 2010). При этом все параметры находились в пределах ПДК, хотя в апреле 2006 г в районе мыса Мальчин в поверхностном слое воды было зафиксировано однократное превышение БПК₅ до 2.53 мг/л. Обычно же в этой точке значения колебались в пределах 0.70–1.87 мг/л (Ковригина, Трощенко, Щуров, 2009). Сообщалось, что в условиях реальных температур (8–10°C) скорости, как окислительных процессов, так и продуцирования восстановленных соединений, снижались в 2 и более раз. В поверхностном 0.6 см слое грунтов Севастопольской бухты возможная скорость окисления органического вещества находилась в пределах 3.14–5.52 мкг/г·ч. Достаточно низкой при естественных температурах была доля активной аэробной микрофлоры – 0.2–31%. При этом степень температурной адаптации анаэробных бактерий оказалась выше, чем аэробных представителей (Чекалов В.П., 2016). В Голубой бухте у г. Геленджик при максимальном содержании кислорода в придонных слоях воды порядка 622–635 мкг-ат/л (9.96–10.16 мг О₂/л) интенсивность его потребления грунтами составляла 3.65×10^3 мг-ат/м³-сут т.е. 2.43 мкг О₂/см³·ч (Богдановская, 1993). Целью настоящих исследований является изучение роли бактериобентоса в процессах деструкции органического вещества и формировании кислородного режима в прибрежных донных отложениях в районе Карадагского природного заповедника.

Материалы и методы

Пробы донных осадков были отобраны в летний период 2012 г. дночерпателем Петерсена в районе Карадага (м. Мальчин; 44,9332°N, 35,2657°E) с глубины 28 м и в прибрежной зоне Двужкорной бухты (44,9904°N, 35,36°E) с глубины 1.5 м. Для исследования брали поверхностный 2-см слой донных осадков.

Влажность и содержание органического вещества определяли гравиметрическим методом соответственно после сушки при +105°C и прокаливании навесок при 500°C. Содержание кислорода и Eh измеряли, используя соответствующие датчики LDO-оксиметра HQ40d (Hach, США).

Скорость суммарного потребления кислорода (СПК) определяли с помощью respiromетрической камеры объемом 60 мл, герметично соединённой с кислородным датчиком. Емкость заполняли морской водой, вносили 0.2 см³ исследуемого ила и плотно закрывали специальной пробкой с газоотводной трубкой. Материал распределяли на площади 20 см² слоем толщиной примерно 0.01 см. Измерение проводили либо при близкой к естественной, либо при экспериментальной температурах в автоматическом режиме ежечасно в течение 12–20 ч.

Определение исходного значения скорости кислородной нейтрализации восстановленных соединений (КНВС) проводили аналогичным образом, предварительно подавив жизнедеятельность бактерий и создав благоприятные условия для окисления восстановленных веществ. Снижая pH 0.1N серной кислотой до 5, добивались смещения соотношения сернистых соединений в воде (S²⁻, HS⁻, H₂S) в сторону преобладания наиболее активно окисляемого сероводорода, что наряду с внесением в измерительную емкость стрептомицина из расчета конечной концентрации 0.1 мг/мл и последующим термостатированием емкости при 8–10°C способствовало также подавлению жизнедеятельности микрофлоры (Чекалов В.П., 2016).

Результаты статистической обработки данных, в частности прямые почасовые измерения СПК и КНВС, приведены в виде средних значений с доверительным интервалом ($p = 0.95$).

Скорость аэробного поглощения кислорода (АПК) при реальной и экспериментальной температурах получали путём вычитания из соответствующих уровней суммарного поглощения (СПК₉ и СПК₂₁) значения КНВС.

Для определения скорости обогащения среды восстановленными соединениями (ВС), часть образцов сохранялась в условиях эксперимента в течение 30–60 суток с последующим измерением КНВС. Разность исходного и полученного значений за определенный интервал времени, соответствующий стабилизации показаний, пересчитывали на количество окисленного сероводорода, учитывая, что в водных растворах сероводород окисляется, как правило, до серы и воды.

Для учета численности аэробных (Аэ), анаэробных (АнАэ) и сульфатредуцирующих гетеротрофных бактерий (СРБ) использовали модифицированную (по Горбенко, 1961) среду Вильсона-Блера. Ранее нами была показана возможность применения этой среды для учета аэробной гетеротрофной микрофлоры в донных осадках (Чекалов, 2012).

Анаэробные бактерии выявляли ранее предложенным способом с использованием двух пробирок разного размера: посевной и вытесняющей (Чекалов, 2014). Посев разведений производили в расплавленную и быстро остуженную до 40–45°C среду, после чего в неё погружали вытесняющую пробирку. В оставшееся пространство между пробирками вносили несколько капель стерильного вазелинового масла, посевная емкость закрывалась ватно-марлевой пробкой, и в таком виде инкубировалась до регистрации результатов. При этом, темноокрашенные колонии учитывались как СРБ, а светлые, как анаэробные гетеротрофные бактерии.

Половину чашек (пробирок) с посевами термостатировали при условиях, соответствующих *in situ*, а другую, по необходимости, при экспериментальной оптимизированной температуре. Процентное соотношение численности визуально различимых колоний, впервые выявленных в посевах более “холодной” инкубации, к появившимся за тот же временной интервал в посевах, растущих при оптимизированной температуре, принимали за уровень температурной адаптации активных форм (T_a). Результаты повторного подсчёта после стабилизации численности через 10–12 суток считали потенциальным максимумом, а их соотношение – потенциальным уровнем температурной адаптации (T_m). То есть:

$$T_a(T_m) = \frac{N_{real} \times 100}{N_{exp}}, \quad (1)$$

где N_{real} – количество визуально различимых колоний гетеротрофов, либо впервые проявившихся (T_a), либо через 10–12 суток (T_m) культивирования посевов при реальной температуре, соответствующей среде обитания; N_{exp} – то же, но при экспериментальной температуре соответственно.

Результаты и обсуждение

Донные осадки в исследуемом районе у мыса Мальчин были представлены глинистыми илами с примесью ракуши, а в бухте Двужкорной – крупнозернистым заиленным песком. Различия глубин и гранулометрического состава обусловили также и расхождение значений некоторых физико-химических параметров, в частности температуры, редокс условий, влажности, содержания органических веществ (табл. 1).

Таблица 1.

Некоторые физико-химические параметры воды и донных отложений

Параметры			м. Мальчин	б. Двужкорная
Глубина, м			28.0	1.5
Температура воды у дна, С°			8.1°	21.0°
Содержание O ₂ у дна, мг/л			8.93	8.12
Eh донных осадков, мВ			90	–182
Влажность донных осадков, %			50.5	25.9
Содержание орг. в-ва, мг/г			37	13
Потребление кислорода. мкгO ₂ /г×ч	СПК	optim	1.63±0.61	1.56±0.73
		real	0.77±0.38	1.56±0.73
	КНВС		0.00	0.38±0.10
	АПК	optim	1.63	1.19
		real	0.77	1.19

Величины СПК, практически совпадающие при искусственно поддерживаемой оптимальной температуре (21°С), в условиях, соответствующих *in situ*, различались в 2 раза. При этом, вследствие разной доли КНВС в грунтах исследуемых районов скорости аэробного потребления кислорода при реальных температурах оказались более сглаженными, чем значения СПК. Так, в заглубленных осадках у м. Мальчин, залегающих в зоне хронически пониженных температур, отмечены нулевые значения темпов окисления и продуцирования восстановленных соединений, тогда как в поверхностном слое прибрежных грунтов Двужкорной бухты по расчетным данным КНВС окислялось до 0.81 мкг H₂S/г·ч, а скорость его образования достигала 0.42 мкг/г·ч. В экспериментальных же условиях, моделирующих сезонное падение

температуры (9°C), она понижалась до 0.32 мкг H₂S/г·ч (рис. 1). Однако высокую скорость окисления восстановленных соединений следует рассматривать как потенциальный максимум, который может быть обеспечен лишь в условиях неограниченного поступления кислорода, что в действительности крайне редко имеет место. В подповерхностном слое осадков, обычно толщиной в несколько миллиметров, окислительные процессы весьма быстро затухают по мере исчерпания кислорода, в то время как продуцирование сероводорода наоборот возрастает. Соотношение и сбалансированность этих процессов определяет, в конечном счете, редокс состояние грунтов.

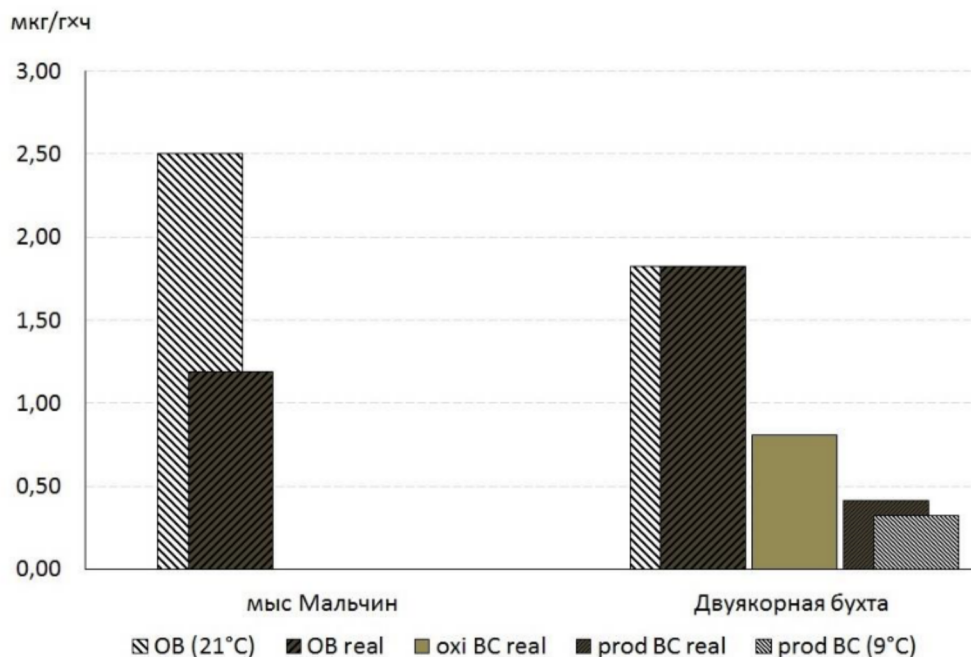


Рис. 1 Скорости деструкции органического вещества (ОВ), окисления (oxi BC) и образования (prod BC) восстановленных соединений при естественных (real) и экспериментальных температурных условиях

Известно, что с падением температуры на 10°C скорость биохимических реакций снижается примерно в 2 раза, что собственно говоря подтверждают и наши данные. Поэтому, полученные при экспериментально оптимизированных условиях результаты при необходимости можно пересчитать на реальную температуру, применив приведенную выше пропорцию.

Исходя из формулы Редфилда и соотношения расхода кислорода (106/138) при окислении органики (Froelich, et al, 1979; Schulz, 2000), а также принятого коэффициента перевода C_{орг} в органическое вещество равного 2 (Агатова и др., 2005), были вычислены скорости утилизации органических соединений аэрофильной микрофлорой (рис. 1). В прибрежной зоне Двужкорной бухты в период проведения исследований реальные условия соответствовали оптимальным, определяя достаточно интенсивное окисление органики – до 1.82 мкг/ч, что в 1.5 раза выше значения, полученного при естественных температурах в подтермоклинной пробе у м. Мальчин, но в 1.4 раза ниже, чем при температурном оптимуме. При постоянстве значения содержания органических веществ в донных отложениях можно в некотором приближении принять равнозначными скорости их седиментации и окисления. В этом случае, появляется возможность оценить один из параметров по величине другого, либо определить тенденции изменений при нестабильной системе.

Данные потребления кислорода согласуются также и с численностью аэробных бактерий (рис. 2).

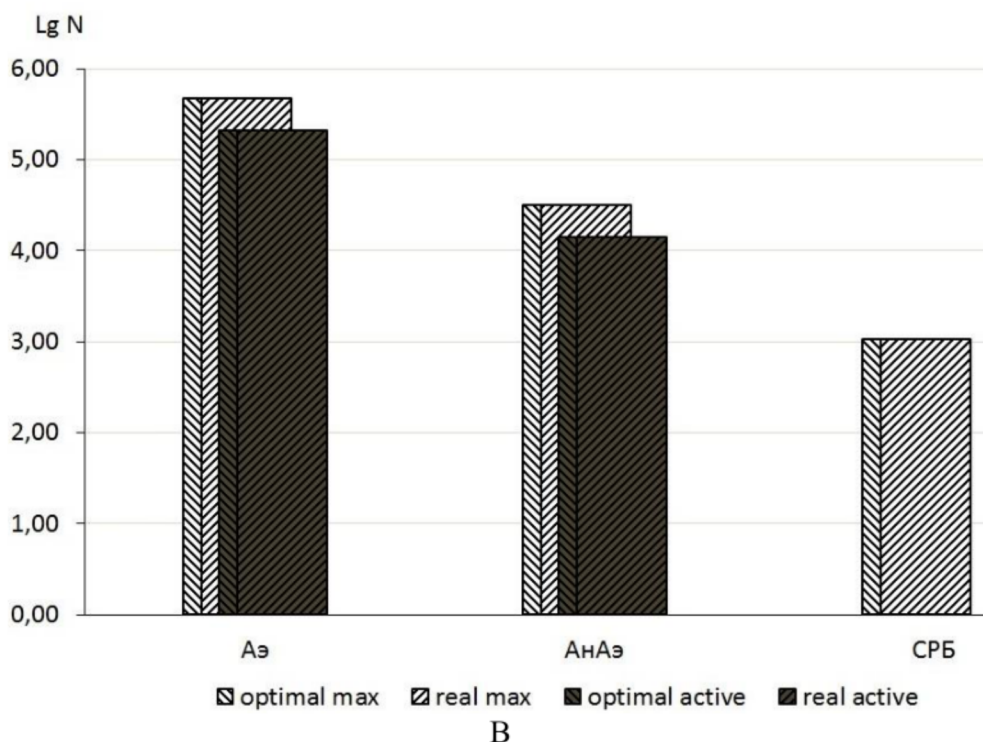
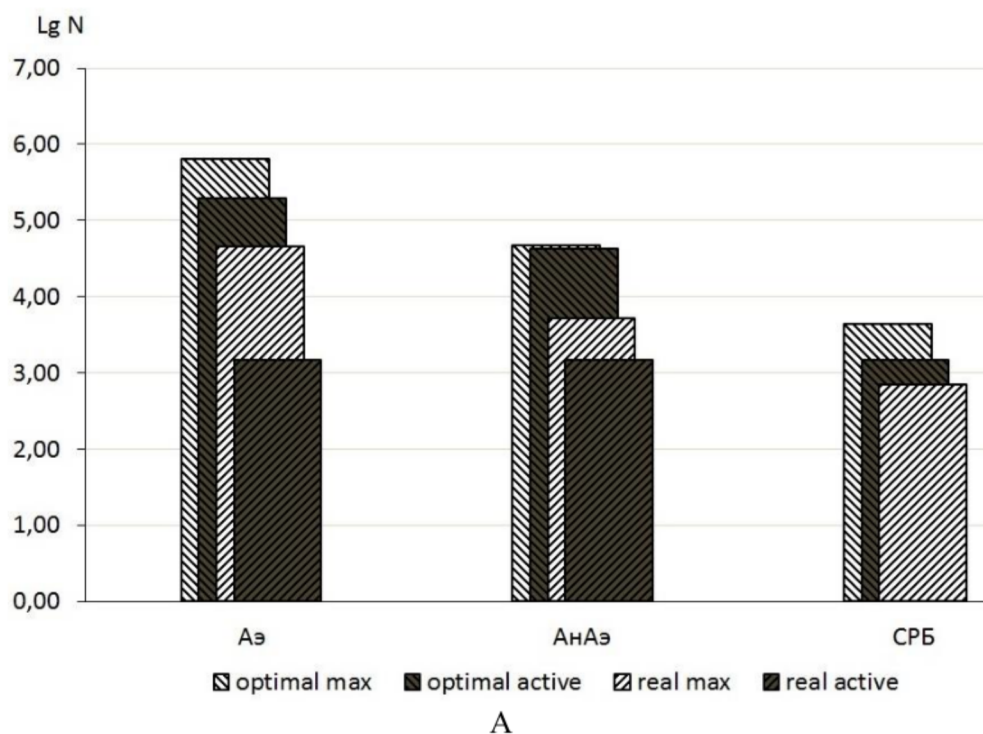


Рис. 2. Соотношение активных форм и максимальной численности аэробных (Аэ), анаэробных (АнАэ) и сульфатредуцирующих (СРБ) бактерий в донных отложениях Карадага (А) и Двужорной бухты (В) при естественных (real) и оптимальных (optimal) температурных условиях

Так, при условиях *in situ* в донных осадках Двужорной бухты наблюдалось значительное превышение как активных форм (2.1×10^5), так и максимального числа аэробов (4.5×10^5), которые в районе Карадага составляли соответственно 1.5×10^3 и

4.5×10^4 КОЕ/г. Получается, что доля активной микрофлоры в условиях соответствующих среде обитания снижалась в 10 раз относительно температурного оптимума. При оптимальных температурах численность активной микрофлоры в грунтах этих районов была близка к 200 тыс КОЕ/г, а вот максимальное количество бактерий, как и отмеченная выше скорость утилизации органики, оказались в 1.4 раза больше в отложениях у м. Мальчин.

Таким образом, здесь зафиксирован весьма низкий уровень температурной адаптации активной аэробной микрофлоры – 0.8%, который достигает потенциального максимума 6.9%, в то время как в грунтах Двужкорной бухты он составлял 100% (табл. 2). Такие же соотношения, но несколько выше, наблюдались и в анаэробной группе.

Таблица 2.

Доля активной микрофлоры при реальных (**real**) и экспериментальных (**optim**) температурных условиях и уровни температурной адаптации активных форм (T_a) и потенциального максимума численности (T_m)

% микрофлоры	м. Мальчин			б. Двужкорная		
	Аэ	АнАэ	СРБ	Аэ	АнАэ	СРБ
real	3.3	28.8	0.0	44.8	44.1	0.0
optim	30.4	91.5	34.1	44.8	44.1	0.0
T_a	0.8	3.5	0.0	100.0	100.0	100.0
T_m	6.9	11.1	15.9	100.0	100.0	100.0

В отличие от подверженной воздействию множества факторов поверхности донных осадков, где обитают преимущественно аэробные представители, более стабильные условия нижележащих горизонтов, основном месте локализации анаэробов, по всей видимости определяют их повышенную адаптацию к данным условиям.

Выводы

Таким образом, несмотря на более высокий деструкционный потенциал заглубленных донных осадков, жесткие условия среды обитания, прежде всего температура и наличие кислорода, определяют значительное снижение численности жизнедеятельной микрофлоры и ее окислительной активности. Так, способностью к росту обладала лишь одна из ста клеток активных форм, и каждая пятнадцатая из возможного максимума численности при оптимальной температуре. При этом скорость окисления органических веществ в донных осадках у м. Мальчинне при реальных условиях не превышала 1.19 мкг/г·ч, тогда как в мелководных грунтах Двужкорной бухты составлял 1.82 мкг/г·ч.

В стабилизированных донных системах с относительно постоянным уровнем содержания органического вещества скорости его окисления и седиментации, как основного процесса поступления в осадки, примерно равны, что позволяет ориентировочно по одному из этих параметров оценить величину другого, а при изменениях количества органической компоненты определить тенденции их соотношения.

Благодарности. Автор выражает признательность к.б.н. М. Б. Гулину за организацию экспедиционных работ и обсуждение материалов настоящей работы.

Список литературы

1. Агатова А.И., Аржанова Н.В., Лапина Н.М. Торгунова Н.И. Красюков Д.В. Пространственно-временная изменчивость органического вещества в прибрежных экосистемах Кавказского шельфа Черного моря // *Океанология*. – 2005. – Т. 45, №5. – С. 670–677.
2. Богдановская В.В. Количественная оценка химического обмена биогенных элементов через границу вода - осадок: Автореф. дисс. канд. геол.-минерал.наук. – Ин-т океанологии, 1993. – 25с.
3. Горбенко Ю. А. О наиболее благоприятном количестве «сухого питательного агара» в средах для культивирования морских гетеротрофных микроорганизмов // *Микробиология*. – 1961. – 30, вып. 1. – С. 168–172.
4. Ковригина Н.П., Бобко Н.И., Смирнова Ю.Д. Гидрохимические показатели морской акватории Карадагского заповедника в 2003–2004 годах // *Материалы IV гидроэкологического съезда Украины*. – Наук. зап. Терноп. НПУ. – Серия: біологія. – 2005. – № 4 (27). – С. 157–159.
5. Ковригина Н.П., Троценко О.А., Щуров С.В. Особенности пространственного распределения гидролого-гидрохимических показателей прибрежной акватории Карадага в современный период (2005-2006) // *Карадаг 2009: Сборник научных трудов, посвящ. 95-летию Карадагск. научн. станц. и 30-летию Карадагск. природн. зап. НАНУ/ ред. А.В. Гаевская, А.Л. Морозова*. – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2009. – С 446–461
6. Ковригина Н.П., Троценко О.А., Губанов В.И., Субботин А.А., Поспелова Н.В. Результаты исследований экологического состояния акватории Карадагского природного заповедника (2009 г.) // *Наук. зап. Терноп. НПУ. – Серия: біологія*. – 2010. – № 3 (44). – С. 116–119.
7. Чекалов В.П. Методические аспекты учета численности бактериобентоса в условиях сезонного колебания температур // *Вісник Дніпроп. Унив. Біологія. Екологія*. – 2012. – 20, №7/1. – С. 101–107.
8. Чекалов В.П. Простой способ культивирования и учёта численности анаэробных бактерий // *Морск. экол. журн.* – 2014. – Т. 13, №1. – С. 44.
9. Чекалов В.П. Абсорбция кислорода донными осадками прибрежных районов Севастополя (Чёрное море) в процессе утилизации органического вещества // *Морск. биол. журн.* – 2016. – Т. 1, № 4. – С. 44–52.
10. Froelich P.N., Klinkhammer G.P., Bender M.L., Luedtke N.A., Heath G.R., Cullen D., Dauphin P., Hammond D., Hartmann B. Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the eastern equatorial Atlantic: suboxic diagenesis // *Geochim. Cosmochim. Acta*. – 1979. – 43. – P. 1075–1090.
11. Schulz H.D. Quantification of early diagenesis: dissolved constituents in marine pore waters // *Marine Geochemistry*. Springer. Berlin. Heidelberg. – 2000. – P. 85–128.

OXIDATIVE ACTIVITY OF BENTHOSE BACTERIA IN THE BOTTOM SEDIMENTS OF KARADAG AND THE DVUYAKORNAYA BAY (BLACK SEA) Chekalov V.P.

*Kovalevsky Institute of Marine Biological Research RAS, Sevastopol, Russian Federation
e-mail: valch@mail.ru*

The influence of the bacterial community on the formation of the oxygen regime and the processes of destruction of organic matter as a function of temperature and redox conditions in the bottom systems of loose soils of contiguous water areas in the Karadag area (Black Sea)

are considered. The harsh environmental conditions in deepened bottom sediments determine a significant decrease of the oxidative activity and number of viable microflora, despite their higher destructive potential under conditions optimization. Only one of the hundred cells of active forms and every fifteenth from the possible maximum number at the optimum temperature possessed the capacity for growth. At the same time, the rate of oxidation of organic matter in bottom sediments by Malchin cape under real conditions did not exceed $1.19 \mu\text{g} / \text{g}\cdot\text{h}$, while in the soil of shallow waters area of the Dvuyakornaya Bay was $1.82 \mu\text{g} / \text{g}\cdot\text{h}$. The data on the ratio of the rates of oxidation and the production of reduced compounds in the bottom sediments of the investigated regions are given.

Key words: bottom sediments, oxygen consumption, bakteriobentos, the Black Sea.

Поступила в редакцию 25.05.2017 г