

ПРОВ 2010

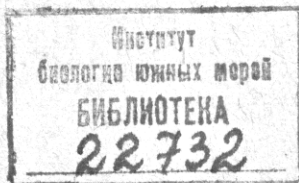
АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ
им. А. О. КОВАЛЕВСКОГО

ПРОВ 98

БИОЛОГИЯ МОРЯ

Вып. 18

БИОЛОГИЯ ОБРАСТАНИИ



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКОВА ДУМКА»
КИЕВ — 1970

биологии. Изд-во АН СССР, М., 1940.

О с т р о у х о в а В.А. Сохранение свойств дрожжей методом лиофильной сушки. - Микробиология, 30, 2, 1961.

Т а т а р е н к о Е.С. и В ы с о ц к а я М.А. К вопросу хранения плесневых грибов. - Микробиология, 29, 4, 1960.

Т и т о в Н.Н. Технология сухих биопрепаратов. Медгиз, М., 1945.

B r a d y B. Recent Research in Freezing and Drying. London, 1959.

C o w a n S. The maintenans of stock cultures of bacteria.- Lab. Practice, 2, 22, 1953.

C h a n c e H. Salt-A Preservative for bacterial cultures.- J. Bacteriol., 85, 3, 1963.

D a a e H. Culture collections of fungi.-Discovery, 14, 10, 1953.

H e c k l y R. Preservation of bakteria by lyophilization.-Advances Appl. Microbiol., 3, 1961.

M a r t s e l l S. Maintenance of cultures under parafin oil.- Appl. Microbiol., 4, 6, 1956.

M i l l e r R., S i m o n s L. Survival of bacteria after twenty one years in the dried state.-J. Bacteriol., 84, 5, 1962.

O t s u k a S., M o n a k o K. Studies on the preservation bakteria.-Japan. J. Microbiol., 5, 2, 1961.

W y n a n t s J. Preservation of yeast cultures by lyophilization.-J. Inst. Brew., 68, 4, 1962.

ОЦЕНКА ПЕРВОНАЧАЛЬНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕДЬСОДЕРЖАЩИХ КРАСОК ПО ИЗМЕНЕНИЮ ИХ ЦВЕТА ПОД ВЛИЯНИЕМ МОРСКОЙ ВОДЫ И БАКТЕРИЙ

Ю.А.Горбенко

В В Е Д Е Н И Е

При создании новых образцов медьсодержащих противообрастаемых красок необходимо иметь представление о первоначальной эффективности их против морских обрастаний. Для этого краски подвергают

ускоренным биологическим испытаниям в лабораторных условиях с целью изучения процесса выщелачивания токсинов - главным образом закиси меди, вредно действующих на организмы обрастаний. Для таких испытаний обычно использовали личинок организмов обрастаний. В исключительных случаях для этой цели предлагали пресноводных рачков, пиявок, морских звезд и других животных.

В общих чертах эти испытания проводят следующим образом. Стекланные цилиндрики окрашивают внутри исследуемым противообрастающим покрытием, заливают морской водой и туда помещают определенный организм. Наблюдатель следит за поведением организма и засекает время, в течение которого прекращаются движения последнего и он погибает. Считается, что чем дольше организм остается живым, тем меньше эффективность данного покрытия и наоборот (Долгопольская, 1959; Долгопольская и Гуревич, 1960; Рагг, 1960).

Этот метод дает удовлетворительные результаты, однако имеет существенный недостаток. Дело в том, что наиболее подходящие объекты для биоконтроля - личинки прикрепляющихся организмов обрастателей в достаточном количестве имеются в планктоне, например Черного моря, только летом и осенью. Поэтому ускоренные испытания противообрастаемых красок таким способом не могут производиться в течение всего года.

Гофман (Goffmann, 1950) для испытаний противообрастаемых красок предложил использовать бактерий. Метод заключался в следующем. Культуральные среды в чашках Петри засеивали бактериями, которые через сутки - двое обильно развивались на поверхности среды. В центре чашки помещали какие-нибудь предметы, окрашенные испытуемой краской, и по величине стерильной зоны роста вокруг краски судили об эффективности последней. Позднее этот метод был несколько изменен. Агаровую среду с бактериями вводили в стекланные градуированные трубки, запаянные с одного конца, которые открытым концом устанавливали на поверхность исследуемых красок. По величине стерильной зоны в трубке судили о токсичности краски (Рагг, 1960).

Бактериальный метод испытания токсичности противообрастающих красок довольно широко используется в нашей стране (Долгопольская, 1959). Этот метод является одной из вариаций метода Гофмана, и объектом для биологического испытания чаще всего применяют культуру *Bacillus subtilis*, которую можно выделить почти в любом месте и в любое время.

Галиненко и Мефедова (1959) несколько модифицировали метод Гофмана — в центре чашки Петри наносили кружок испытуемой краски. После просушки чашки заливали рыбо-пептонным агаром и засеивали смешанными культурами морских бактерий. По величине стерильной зоны над пятном окраски оценивали токсичность краски для организмов обрастаний.

Во всех случаях, как было видно, бактериальный метод сводился к тому, что по величине стерильной зоны судили об эффективности испытуемого покрытия. Однако такой путь использования бактерий в качестве индикаторов эффективности красок в принципе неверен. Во-первых, потому, что бактерии реагируют на ряд токсинов иначе, чем макроорганизмы обрастаний. Например, фенолы, ароматические кислоты и нитропроизводные являются ядами для бактерий, в то время как на основных организмах обрастаний (макроорганизмов) они не действуют, а яды для этих организмов не ядовиты для бактерий (Долгопольская, 1959; Parf, 1960). Бактерии, развиваясь на покрытии, содержащем бактериальный яд^{*}, могут на какой-то промежуток времени давать стерильную зону роста, но это не будет служить показателем эффективности против обрастаний. Во-вторых, как показала М.А. Долгопольская (1959), "длительные и многократные наблюдения за ходом обрастания в море различных образцов в процессе испытания новых противообрастаемых составов, в том числе и имеющих длительный срок эффективного действия (более 1,5 года), показали, что нередко уже с первых дней погружения образца в море и до конца испытательного срока, наряду с полным отсутствием настоящих обрастателей, на окрашенной поверхности возникает и сохраняется бактериальная пленка, которая иногда разрастается до слоя 1-2 мм толщиной".

Таким образом, угнетение развития бактерий токсинами краски-понятие очень условное, и если оно иногда имеет место, вряд ли можно использовать его для каких-либо прогнозов эффективности покрытия.

При использовании бактерий в качестве индикаторов эффективности противообрастаемых красок необходимо было найти и применить какие-то признаки активности красок, непосредственно связанные с деятельностью морских бактерий. К таким признакам можно

^{*} Следует отметить, что бактерии могут использовать почти любые органические вещества в качестве источника углерода, в том числе и обсеядовитые, например KCN. Все зависит от видовой при-

относительно а) закономерности в формировании первичной слизистой пленки, которая образуется на поверхности любых противообрастаемых красок (она состоит в основном из бактерий, частиц детрита и небольшого числа диатомовых водорослей); б) образование окрашенных соединений меди в слизистой пленке на поверхности медьсодержащих красок. Этот признак непосредственно связан с "работой" эффективно действующих красок.

Как отмечали Вейс и Торкингтон, (сб. Морское обрастание и борьба с ним, 1957) на эффективных медьсодержащих противообрастаемых красках в морской воде при 40°C быстро образуется серый или зеленый осадок солей меди. Более поздние исследования показали, что в случае растворения закиси меди, или металлической меди, в морской воде при достаточном доступе кислорода конечным продуктом реакции является сине-зеленый осадок, состоящий из карбоната меди, гидроокиси и хлорида в несколько изменяющихся соотношениях.

В результате многочисленных исследований, посвященных изучению этого вопроса, ряд американских авторов пришел к выводу, что осадки основного карбоната меди служат показателем хорошего качества противообрастаемых красок. При этом подчеркивается, что медная поверхность, не обросшая после продолжительного испытания в морской воде, всегда покрывается зеленым осадком. Соединения меди, выделяющиеся противообрастаемыми красками, очевидно, не угнетают развитие бактерий на красках, так как в слизистой пленке на их поверхности, состоящей в основном из бактерий, может содержаться во много раз больше меди, чем в морской воде, насыщенной ею ("Морское обрастание и борьба с ним", 1957).

На поверхность этих красок бактерии из морской воды привлекаются органическими веществами, составляющими их пленкообразующую основу. Бактерии, осевшие на краски, получают дополнительный источник органических веществ за счет растворения канифоли морской водой, и вследствие этого численность их повышается по сравнению с неокрашенными стеклянными пластинками, где бактерии в основном могут использовать только растворенные органические вещества морской воды, адсорбированные поверхностью

надлежащие бактерии, концентрации вещества и времени для адаптации к ядовитым веществам.

пластинок. Рост числа бактерий на поверхности красок влечет за собой увеличение количества выделяемых ими метаболитов, растворяющее действие которых на органическую основу красок увеличивается, что может повлечь за собой растворение синтетических высокомолекулярных веществ, труднорастворимых в воде.

Это, очевидно, имеется в виду, когда говорят об использовании морскими бактериями органических компонентов противобрастаемых красок, которое ведет к дополнительному выделению в воду соединений меди, то есть повышает эффективность последних (Starkey, 1957; Ренн, Дарси, Райли "Морское обрастание и борьба с ним", 1957); Долгопольская, Гуревич и Шапиро, 1960; Долгопольская, Шапиро, Горбенко, 1961; Горбенко, 1963, 1964).

Изучая развитие гетеротрофных бактерий на различных медьсодержащих красках у берегов Кубы путем заливки окрашенных пластинок, бывших погруженными в море средой № 4, мы заметили следующее. На поверхности этих красок и рядом с ними в среде также обнаруживались синеватые или зеленоватые соли меди. Следовательно, образование осадка солей меди на красках имело место не только в море, но и в культуральной среде № 4, то есть имела общность "работы" красок в море и в лабораторных условиях.

В предлагаемом методе для определения первоначальной эффективности новых образцов противобрастаемых красок использовалась особенность поверхности медьсодержащих красок откладывать окрашенные соли под влиянием морской воды и бактерий, разлагающихся на красках.

Описание метода

Свежеприготовленные медьсодержащие краски и эффективная против обрастаний краска-эталон, хорошо размешанные стеклянной палочкой в течение получаса, в два слоя с помощью кисти наносили на поверхность матированных предметных стекол в вытяжном шкафу или на открытом воздухе. Количество окрашенных пластинок готовили в нескольких повторностях для каждой краски на каждый день наблюдений. После просушивания в течение двух суток пластинки вставляли одним концом в прорези резиновых шлангов, закрепленных в проволочных рамках, которые погружали в море на глубину 1 м. Чтобы исключить попадание загрязнения из поверхностной пленки, перед погружением пластинок ее необходимо хорошо разгрести. Контрольные пластинки в море не погружали.

Через 2, 5, 10, 15, 20, 30 суток серию пластинок осторожно извлекали из воды после разгребания поверхностной пленки, держа за боковые края руками, хорошо протертыми спиртом, чтобы не занести на них посторонних микроорганизмов. Пластинки доставляли в специальном сосуде с водой, взятой также у стенда, избегая касания их друг с другом. В лаборатории проводили следующие исследования.

1. Определяли изменение цвета поверхностного слоя красок, находившихся в море, путем сравнения их окраски с таковой же контрольных пластинок. Через 2 или 5 суток обычно уже можно было заметить, что цвет эффективных противообрастаемых красок в той или иной мере изменялся. Это свидетельствовало о том, что пленкообразующая основа красок уже начала растворяться под влиянием морской воды и метаболитов бактерий и соли меди стали откладываться на поверхности красок. Сравнивая интенсивность окрашивания опытных красок с окраской эффективной краски-эталоны, наблюдатель уже может получить первое ориентировочное представление об эффективности испытываемых красок. После 10-15 и т.д. суток погружения в море цвет большинства исследуемых противообрастаемых красок обычно заметно отличался от контроля, показывая, что краски в море начали "работать".

Часть окрашенных пластинок, извлеченных из морской воды, в двух повторностях для каждой краски заливали в чашках Петри агаровой средой № 4 (Горбенко, 1961), охлажденной примерно до 40°C. Все операции выполняли с соблюдением приемов обычных для микробиологических работ, чтобы не занести в среду посторонней микрофлоры. После заливки средой чашки ставили в термостат (26-27°C). Цель этой операции — поместить морских гетеротрофных бактерий в среду с повышенным содержанием органических веществ по сравнению с условиями моря, с тем чтобы усилить жизнедеятельность гетеротрофов, полагая что от этого действие метаболитов последних на краски также увеличится. При этом не исключалось влияние и морской воды, которая составляет 97,5% состава среды № 4. Через 2 - 3 суток чашки вынимали из термостата, раскладывали на листы белой бумаги и производили следующие наблюдения.

2. Визуальное определение количества выделившейся меди на поверхности красок рядом с ними в среде путем сравнения интенсивности цвета испытываемых красок с таковой же краски-эталоны, также находившейся в море. Эти наблюдения позволяли судить о том, с

какой интенсивностью исследуемая краска выделяет медь на свою поверхность и в окружающую среду по сравнению с эталоном.

3. Определение меди в среде вблизи окрашенных пластинок в виде окисленной двухвалентной формы, но содержащейся в красках в форме одновалентной закиси меди, проводилось с помощью дитизона (Тредвелл и Голл, 1946). Для этого 1,0–1,5 мг дитизона растворяли в 50 мг четыреххлористого углерода в темной склянке с притертой пробкой и хранили в темном месте. Полученный раствор зеленого цвета годен в течение нескольких дней.

Несколько миллилитров раствора дитизона отливали в пробирку с корковой пробкой и устанавливали в штатив вместе с химически чистыми маленькими стеклянными пробирками, закрытыми резиновыми пробками. Микробиологической петлей, обожженной над пламенем спиртовой горелки, вырезали кусочек среды размером примерно 0,5 на 1,0 мм, отступая на 1–2 мм от бокового края окрашенной части пластинки, чтобы случайно не захватить краски, который помещали в маленькую пробирку с 1 мм дистиллированной воды. Пробирку осторожно нагревали над пламенем горелки до полного растворения кусочка среды и в горячую смесь наливали 0,2 мл дитизона, закрывали пробкой и хорошо взбалтывали в течение 1–2 мин. Такой обработке подвергали каждую исследуемую краску и эталон.

Если в среде имелась медь, то капля раствора дитизона в пробирке приобретала окраску от светло-желтой до коричнево-бурой. Когда меди в среде не оказывалось, дитизон окрашивался в оттенки малинового цвета. Контролем в этом случае служила среда № 4, не содержащая меди до заливки ею окрашенных пластинок.

Результаты получали благодаря сравнению окраски дитизона опытных красок с эталоном. Эти анализы обычно подтверждали данные визуальных наблюдений за изменением цвета красок, залитых средой № 4. Кроме того, с помощью дитизона удается обнаружить выделившуюся красками медь и в том случае, когда ее соединения в среде еще не заметны визуально.

Сопоставляя результаты трех видов наблюдений, описанных выше, мы получали сведения о предварительной эффективности испытываемых красок по выделению меди при сравнении с эффективной краской-эталон.

Для ускоренных испытаний красок достаточно 2–5 суток погружения их в море с последующими 3 видами определений, так как

сведения о предварительной эффективности опытных красок, полученные через 2 и 5 суток, в дальнейшем обычно подтверждались. Серия наблюдений за "работой" красок в динамике в течение месяца дает только более достоверные результаты об эффективности исследуемых красок.

Предлагаемый метод имеет преимущество по сравнению с другими методами биологических испытаний красок в том, что, применяя его, можно испытывать медьсодержащие краски в любое время года независимо от сезона. Описанный метод, очевидно, может применяться для определения эффективности новых противообрастаемых красок наравне с другими методами биологических исследований.

ВЫВОДЫ

Для оценки первоначальной эффективности противообрастаемых красок предлагается использовать появление синеватого или зеленоватого окрашивания солей меди на поверхности красок. Это явление вызывается совместным действием морской воды и гетеротрофных бактерий на пленкообразующую основу красок, содержащих закись меди в качестве основного яда.

Метод осуществляется погружением пластинок, окрашенных различными противообрастаемыми красками, в море на различные сроки с последующим проращиванием гетеротрофных бактерий, осевших на красках в агаровой среде № 4. Медь, выделяющаяся красками, определяется в среде визуально в виде окрашенных солей и аналитически - с помощью дитизона.

Сравнением результатов наблюдений опытных красок с эффективной краской-эталоном определяется первоначальная относительная эффективность этих красок.

ЛИТЕРАТУРА

Горбенко Ю.А. О наиболее благоприятном количестве "сухого питательного агара" в средах для культивирования морских микроорганизмов-гетеротрофов. - Микробиология, 28, 6, 1961.

Горбенко Ю.А. Образование бактериальной пленки на погруженных в морскую воду пластинках, покрытых противообрастающими красками. - В кн.: Тр. Севаст.биол. ст., 16, 1963.

Горбенко Ю.А. Формирование первичной слизистой пленки на предметах, погруженных в морскую воду. Автореф. дисс. М.-Севастополь, 1964.

Долгопольская М.А. О методике биоконтроля эффективности противообрастающих покрытий. - В кн.: Тр. Севаст. биол. ст., 12, 1959.

Долгопольская М.А., Гуревич Е.С. и Шапиро А.З. Влияние бактериальной пленки на процесс защелачивания ядов из противообрастающего красочного слоя. - В кн.: Тр. Севаст. биол. ст., 13, 1960.

Долгопольская М.А., Шапиро А.З., Горбенко Ю.А. Разрушение пленкообразующей основы необрастающих красок морскими микроорганизмами. - В кн.: Тр. Севаст. биол. ст., 14, 1961

Калиненко В.О. и Мефедова Н.А. Бактериальное обрастание подводных частей корабля. - Микробиология, 25, 2, 1956.

Морское обрастание и борьба с ним. Воениздат, М., 1957.

Рагг М. Защита судов от обрастания и коррозии. Судпромгиз, Л., 1960.

Тредвелл Ф.П., Голл В.Т. Качественный анализ. Госхимиздат, М., 1946.

Hoffman A. Kieler Meeresforschungen, 11, 1, 1950.

Starkey R. Susceptibility of matrix constituents of antifouling paints to microbial attack in sea water. - Canad. J. Microbiol., 3, 2, 1957.

ВЗАИМОСООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ ПОВЕРХНОСТЬЮ ПРОТИВООБРАСТАЕМОЙ КРАСКИ I, МОРСКОЙ ВОДОЙ И ОРГАНИЗМАМИ ОБРАСТАНИЯ

М.А. Долгопольская

Проблема обрастания как у нас, так и за рубежом до последнего времени не занимала сколько-нибудь значительного места в числе вопросов, подлежащих всестороннему и глубокому изучению, несмотря на ее большой научный и практический интерес. Это привело к тому, что наука в этой области оказалась неподготовленной к решению тех задач, которые поставили перед ней новые темпы и высокий уровень развития народного хозяйства.

Без глубокого изучения всех тончайших жизненных процессов