

Ю. В. ДОРОШЕНКО

МИКРОФЛОРА АКВАТОРИИ В РАЙОНЕ РАЗМЕЩЕНИЯ СИСТЕМ ГИДРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ МОРСКИХ ВОД

Приведены данные по численности и биохимическим особенностям бактерий перифитона и морской воды в районе размещения систем гидробиологической очистки морских вод. Установлено, что численность микроорганизмов перифитона систем гидробиологической очистки в 100 – 10000 раз выше, по сравнению с их численностью в морской воде. Численность бактерий в воде при волновом воздействии возрастает в 10 – 100 раз и может достигать значений, характерных для микроорганизмов перифитона. Все выделенные культуры бактерий и дрожжей способны расти на нефти и нефтепродуктах.

Основное участие в преобразовании органического вещества автохтонного и аллохтонного происхождения в морской среде принимает микрофлора, и, прежде всего, микроорганизмы перифитона. Данное обстоятельство в частности используется в системах гидробиологической очистки морской воды [14]. Наиболее обстоятельно развитие микрообрастания в Чёрном море было изучено Ю. А. Горбенко [1, 2], однако биохимическая активность этого сообщества им не изучалась. Практически отсутствуют данные по биохимии перифитона и в более поздних работах [12], хотя некоторые материалы по данной проблеме и приводятся в [3, 4, 5, 8].

В начале 90-х годов 20-го столетия в акватории Нефтегавани Севастополя были развёрнуты системы гидробиологической очистки (СГО). К началу исследования на системах сформировалось и функционировало сообщество обрастания, состоящее преимущественно из мидий. Была проведена оценка фильтрационной активности систем, а также бентосных сообществ в районе их размещения [9]. Однако подробное и длительное изучение микрофлоры перифитона этих систем не проводилось.

В этой связи целью наших исследований было изучение микроперифитона в системах гидробиологической очистки, а также микроорганизмов морской воды в районе размещения указанных систем.

Материал и методы. Пробы обрастаний отбирались ежемесячно с февраля 2005 по февраль 2006 гг. с капроновых носителей (СГО – 1) и с января 2005 по февраль 2006 гг. с металлических элементов сетевого заграждения (СГО – 2), расположенных в Нефтегавани Севастопольской бухты (Чёрное море) (рис. 1). В те же сроки в центре акватории Нефтегавани ежемесячно отбирались пробы морской воды стерильным батометром.

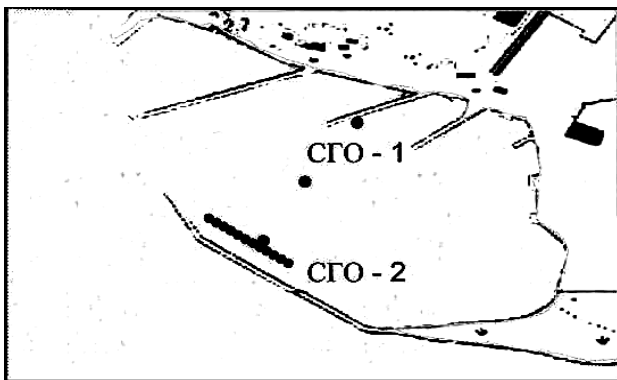


Рисунок 1. Схема станций в акватории Нефтегавани
Figure 1. Scheme of stations location in Oil Harbor

Обрастания отбирали скребком в полиэтиленовые пакеты, закреплённые на ручке скребка, с глубины 5 – 20 см. Таким образом, отвалившиеся обрастания попадали в полиэтиленовый пакет вместе с водой. После поднятия пробы на борт мотобота содержимое мешка (вода и обрастания) переносили в 5-литровые пластмассовые вёдра с плотно прилегающими крышками, предварительно обработанные спиртом. После доставки в лабораторию из вёдер с обрастаниями в

© Ю. В. Дорошенко, 2007

Экология моря. 2007. Вып. 73

стерильных условиях были отобраны пробы воды (смыв 1 и смыв 2). После этого скальпелем делали соскобы с поверхности мидий в чашки Петри с соблюдением стерильности, предварительно удаляя асцидий, мшанки, водоросли-макрофиты (соскоб 1 и соскоб 2). Масса соскоба составляла 2 г, что было достаточно для проведения микробиологических исследований.

Для изучения первичных обрастаний в феврале 2005 г. в районе СГО – 2 на глубине 1 м были размещены изготовленные из цемента 12 кубиков с гранью 4×4 см и 12 обломков прибрежных скал примерно тех же размеров [13]. Указанное количество образцов позволяло ежемесячно отбирать для анализа по одному образцу на протяжении года с марта 2005 по февраль 2006 гг. Смывы с поверхности кубика и камня площадью в 16 см² выполняли стерильным ватным тампоном в стерильные пробирки с физиологическим раствором, объёмом 20 мл.

Всего обработано 27 проб обрастаний, 27 проб воды, в которой транспортировались обрастания (смывы), 14 проб воды из центра гавани, а также 24 смыва с цементных кубиков и камней, соответственно по 12 смывов с каждого субстрата.

В соскобах, смывах с обрастаний и в воде из центра гавани определяли общую численность гетеротрофов, нефтеокисляющих, липолитических, амилолитических и фенолоокисляющих бактерий, а в смывах с кубиков и камней – только общее количество гетеротрофов и нефтеокисляющих бактерий. Численность бактерий определяли методом предельных разведений на соответствующих селективных питательных средах [11]. Для исследования численности гетеротрофных бактерий использовали пептонную воду, для нефтеокисляющих – среду Диановой – Ворошиловой (Д-В) с добавлением нефти, для липолитических – среду Д-В с добавлением жира, для амилолитических – среду Д-В с добавлением крахмала, для фенолоокисляющих бактерий – среду Калабиной. Полученные данные по численности микроорганизмов подвергали статистической обработке по [11].

Параллельно с количественным учётом микроорганизмов были выделены культуры бактерий и дрожжей. Накопительную культуру бактерий получали на пептонной воде [10], дрожжей – по [6] на солодово-дрожжевом бульоне [8]. Способность и интенсивность роста дрожжевых и бактериальных культур на нефти и нефтепродуктах изучали по известным методикам [7, 10]. В качестве источника нефтяных углеводородов использовали дизельное топливо, флотский мазут и сырую нефть. Рост на минеральной среде с нефтепродуктами оценивали визуально по характерным показателям роста микроорганизмов. Эксперименты проводились с суточными культурами бактерий и трёхсуточными культурами дрожжей. Для большей наглядности приводимые в статье рисунки представлены в логарифмической шкале.

Результаты и обсуждение. За исследуемый период общее количество гетеротрофов в соскобе 1 (капроновый носитель) колебалось от 150 тыс. до 25 млн. кл./г, количество углеводородокисляющих бактерий находилось в пределах 950 – 45 тыс. кл./г, что на 3 – 4 порядка ниже общей численности гетеротрофных микроорганизмов (рис. 2). Численность гетеротрофных микроорганизмов в соскобе 2 за период исследования колебалась от 25 тыс. до 25 млн. кл./г, нефтеокисляющих бактерий – от 450 до 95 тыс. кл./г, что на 2 – 3 порядка меньше общей численности гетеротрофов. Максимальное значение численности нефтеокисляющих бактерий в обрастаниях с капронового носителя (45000 кл./г) отмечено в августе, минимальное (950 кл./г) – в июне и в конце ноября.

Максимальные значения углеводородокисляющих микроорганизмов в обрастаниях на обеих системах выявлены в августе (95000 кл./г), что, по-видимому, объясняется температурой воды, оптимальной для роста бактерий, а также в обрастаниях на СГО – 2 в начале ноября, когда наблюдалось нефтяное загрязнение возле системы в виде толстой пленки, плавающей на поверхности моря. Наименьшая численность нефтеокисляющих бактерий в перифитоне СГО – 2 отмечена в апреле (450 кл./г). О наличии в акватории гавани органических загрязняющих веществ свидетельствуют довольно высокие значения липолитических, амилолитических и фенолоокисляющих бактерий (рис. 3).

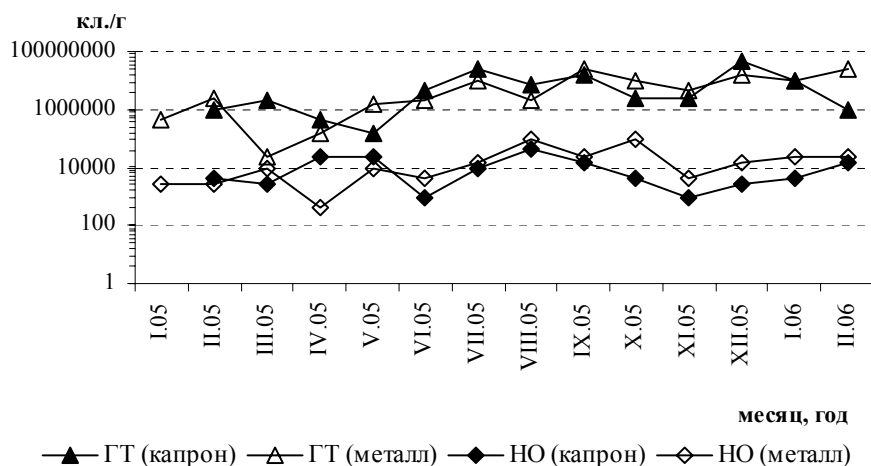


Рисунок 2. Динамика численности гетеротрофных (ГТ) и нефтеокисляющих (НО) бактерий на различных носителях

Figure 2. Dynamics of number heterotrophic and oil-oxidizing bacteria on the different substance

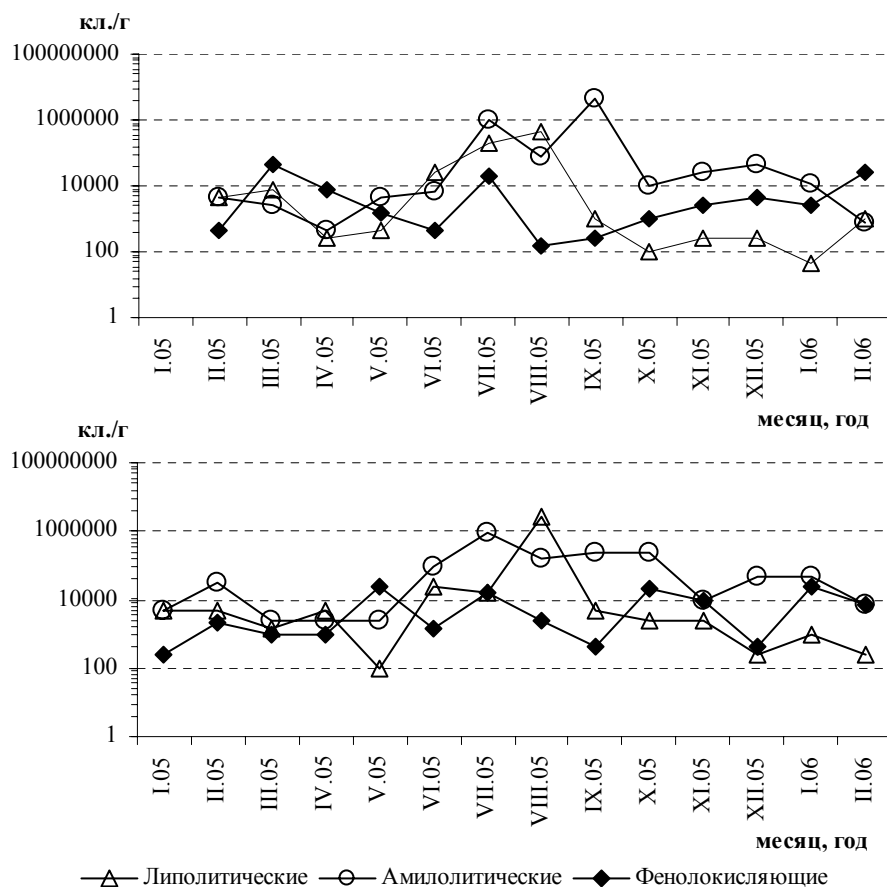


Рисунок 3. Численность различных групп бактерий на СГО-1 и СГО-2

Figure 3. Number of various groups of bacteria on HCS-1 and HCS-2

Численность всех групп микроорганизмов широко варьировала в пределах $10^2 - 10^7$ кл./г, но какой-либо закономерности выявить не удалось.

Полученные данные показывают, что численность гетеротрофных, углеводородо-кисляющих и липолитических бактерий на обеих системах находится в пределах одного порядка величин, с небольшим превышением амилалитических бактерий на первой системе и фенолокисляющих бактерий на второй.

При отборах проб обрастаний на системах замечено, что на сформировавшемся сообществе обрастания имеется значительный слой взвешенного вещества (заилиение), которое образует облако мути при попытке снять часть обрастания. Подобные процессы могут происходить при волновом воздействии во время шторма, когда частицы взвешенного вещества попадают в воду и постепенно оседают на дно, а также при чрезмерном накоплении детрита в перифитоне. В связи с этим представлялось целесообразным определить численность микроорганизмов в воде, в которой доставлялись пробы обрастаний (рис. 4).

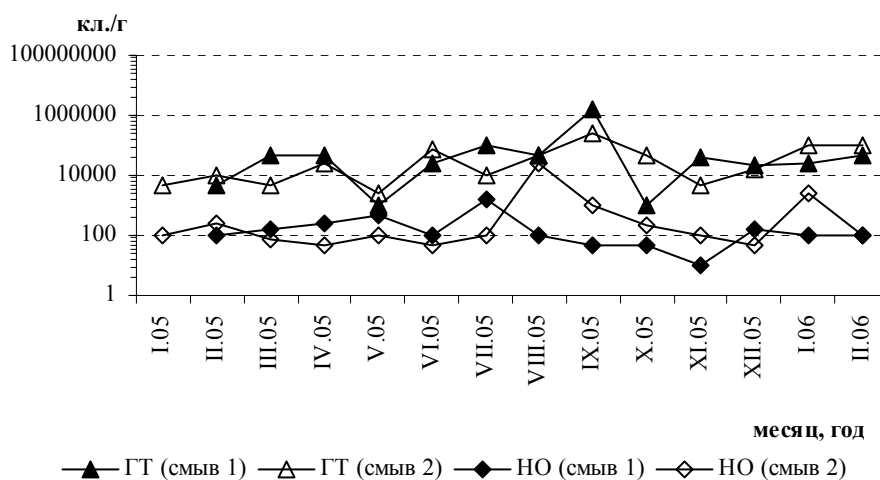


Рисунок 4. Динамика численности гетеротрофных и нефтеокисляющих бактерий в смывах
Figure 4. Dynamics of number heterotrophic and oil-oxidizing bacteria in washouts

Анализируя результаты, представленные на рис. 4, можно отметить значительную вариабельность полученных данных. В мае в смыве 1 и в августе в смыве 2 зарегистрированы всплески количества нефтеокисляющих бактерий, значения которых составили соответственно 47 и 56 % от общего количества гетеротрофов, тогда как в другие месяцы эти значения не превышали 5 % в смыве 1 и 4 % в смыве 2.

Липолитические, амилалитические и фенолокисляющие микроорганизмы в обоих смывах были высеяны в 100 % проб. Исключение составляет группа липолитических бактерий в смыве 1, которую не удалось выявить в апреле (табл. 1). Численность амилалитических бактерий варьировала от 25 кл./мл до 250 тыс. кл./мл. Эти максимальные значения наблюдались в сентябре в смыве 1 и в августе в смыве 2, и на 2 порядка превышали максимальную численность фенолокисляющих микроорганизмов в обоих смывах, а также липолитических в смыве 2. В целом численность этих групп микроорганизмов ниже, чем в соскобах, в 100 – 1000 раз. При визуальных наблюдениях воды в гавани в момент отбора проб отмечено постоянное присутствие на поверхности нефтяной пленки, а также характерный запах нефтепродуктов. Поэтому для полной характеристики акватории необходимо было выполнить микробиологическое исследование воды, отбираемой между системами гидробиологической очистки (табл. 2).

Таблица 1. Численность различных групп бактерий в смывах с обрастаний, кл./мл
Table 1. Number of various groups of bacteria in wash-outs, cell/ml

Дата отбора проб	Смыв 1			Смыв 2		
	Липо-литические	Амилито-литические	Фенол-окисляющие	Липо-литические	Амилито-литические	Фенол-окисляющие
1	2	3	4	5	6	7
I.05	-	-	-	95	250	0,4
II.05	450	25	150	45	25	25
III.05	45	450	250	2,5	150	25
IV.05	0	45	250	250	2500	250
V.05	9,5	25	45	0,4	95	0,3
VI.05	2500	950	250	2500	4500	2,5
VII.05	25000	9500	1500	4500	2500	4500
VIII.05	9500	45000	25	2500	250000	250
IX.05	450	250000	0,9	45	4500	25
X.05	0,4	25	9,5	3	450	2500
XI.05	4,5	150	25	4,5	450	250
XII.05	4,5	450	16,5	0,4	250	1,5
I.06	0,4	400	45	25	1500	450
II.06	0,9	45	25	0,4	25	4,5

Таблица 2. Результаты микробиологического исследования воды в акватории Нефтегавани, кл./мл
Table 2. Results of microbiological researches of water in Oil Harbor, cell/ml

Дата отбора проб	Общее количество гетеротрофов	Нефте-окисляющие	Липо-литические	Амилито-литические	Фенол-окисляющие
I.05	75	4,5	25	0	0,9
II.05	450	0,4	0,9	2500	2,5
III.05	200	0,4	2,5	0,9	0
IV.05	95	0,9	0	0	0,4
V.05	45	1,5	0	4,5	1,5
VI.05	95	0,4	15	4,5	4,5
VII.05	250	4,5	95	15	4,5
VIII.05	250	4,5	1,5	6,5	0,9
IX.05	250	2,5	0,4	45	4,5
X.05	750	4,5	0	0,7	4,5
XI.05	450	2,5	0	2,5	2,5
XII.05	450	4,5	0	25	0,4
I.06	2500	25	3	15	15
II.06	95	2,5	0	0	0,7

Численность общего количества гетеротрофов в воде варьировала в пределах 20 – 2500 кл./мл. Интересно отметить, что возрастание численности приходилось на начало ноября, когда наблюдали разливы нефтепродуктов, а максимальное значение – на начало февраля, когда растаяла ледяная корка в Нефтегавани. Численность нефтеокисляющих бактерий колебалась в пределах 0,4 – 25 кл./мл. В целом аналогичные данные были получены ранее для морской воды Севастопольской бухты [9].

Помимо указанных групп бактерий, липолитические бактерии были высеяны в 57 % проб, амилолитические – в 71 %, а фенолоокисляющие в 93 % проб. Эти группы микроорганизмов были представлены лишь единичными клетками на 1 мл воды. Исключение составляли амилолитические бактерии, численность которых в феврале 2005 г. достигла 2500 кл./мл.

Таким образом, по численности бактерий на обеих системах наблюдалась сходная картина. Однако следует отметить, что общее количество гетеротрофов и нефтеокисляющих бактерий в воде между системами значительно ниже, чем в перифитоне. Такая же ситуация характерна и для донных осадков, в сравнении с морской водой. Высокая численность микроорганизмов во взмученной воде, в которой в лабораторию доставлялись образцы, подтверждает тот факт, что наибольшая часть бактерий концентрируется на взвешенных частицах.

В смывах и с кубиков, и с камней численность нефтеокисляющих бактерий колебалась в пределах 0,9 – 1000 кл./мл (рис. 5). В то же время количество гетеротрофов в смывах с кубиков варьировало от 1500 до 250 тыс. кл./мл, в смывах с камней – от 950 до 75 тыс. кл./мл. В целом, численность бактерий была выше в смывах с кубиков, хотя в обоих смывах был отмечен всплеск бактерий, характерный для теплых месяцев.

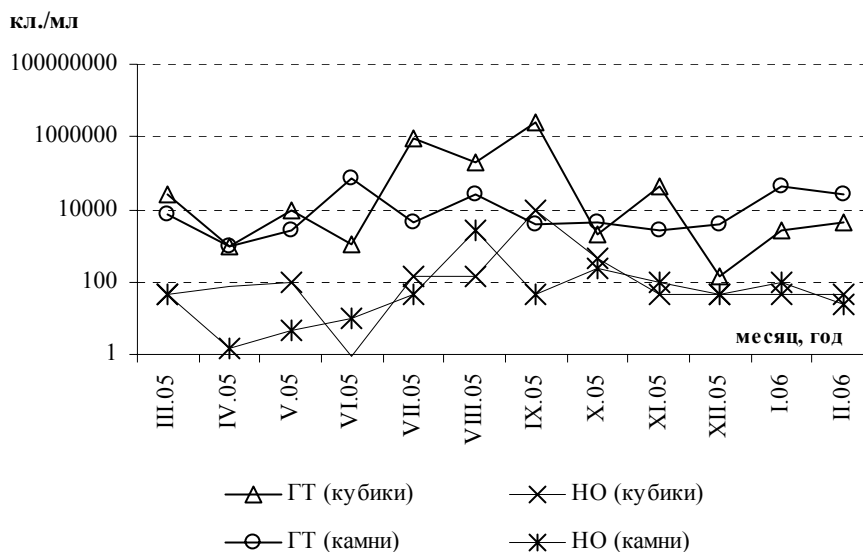


Рисунок 5. Численность гетеротрофных и нефтеокисляющих бактерий на кубиках и камнях
Figure 5. Number heterotrophic and oil-oxidizing bacteria on blocks and stones

Наряду с количественным учётом микроорганизмов представляет интерес изучение их биохимических свойств, в частности, способности использовать нефть и нефтепродукты в качестве единственного источника углерода и энергии. Для этой цели были использованы дикие штаммы бактерий и дрожжей. В эксперименте участвовало 164 культуры бактерий и 67 культур дрожжей [8], выделенные в акватории Нефтегавани. Результаты роста бактериальных культур представлены на рис. 6.

Наиболее активный рост бактерий наблюдали на флотском мазуте – 88 % выделенных культур. Значительно хуже бактерии росли на минеральной среде с добавлением сырой нефти (73 %), причем в 7 % случаев рост бактериальных культур с этим источником углерода вообще отсутствовал. Результаты роста дрожжевых культур иллюстрирует рис. 7. Как видно из представленных на рис. 7 данных, существенный рост (обильный и умеренный) наблюдался у 81 % культур дрожжей на сырой нефти, 75 % на флотском мазуте и 63 % на дизельном топливе.

Сравнивая приведённые данные, можно отметить, что дрожжи, выделенные из перифитона систем гидробиологической очистки, как и бактерии из того же источника, способны использовать нефть и нефтепродукты в качестве единственного источника углерода и энергии. Однако если бактерии давали обильный рост на флотском мазуте и дизельном топливе, то дрожжи более активно росли на сырой нефти.

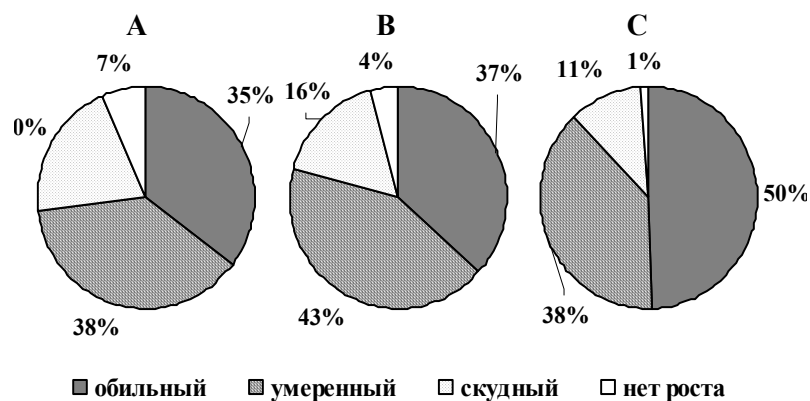


Рисунок 6. Рост бактерий на минеральной среде с добавлением: А – сырая нефть; В – дизельное топливо; С – флотский мазут

Figure 6. Growth of bacteria on a mineral medium with adding: А – oil; В – diesel oil; С – black oil

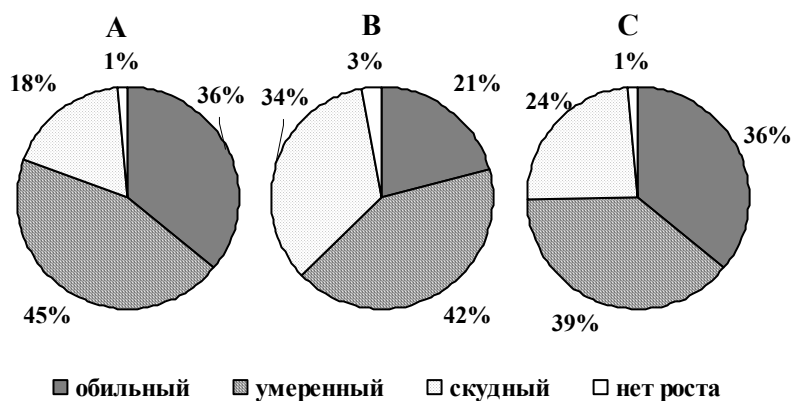


Рисунок 7. Рост дрожжей на минеральной среде с добавлением: А – сырая нефть; В – дизельное топливо; С – флотский мазут

Figure 7. Growth of yeast on a mineral medium with adding: А – oil; В – diesel oil; С – black oil

Выводы. 1. Исследования нефтеокисляющих микроорганизмов перифитона, проводимые в течение года в акватории Нефтегавани Севастополя, показали, что их численность в системах гидробиологической очистки в 100 – 10000 раз выше, по сравнению с таковой в морской воде. При волновом воздействии численность углеводородоокисляющих бактерий в воде возрастает в 10 – 100 раз и может достигать значений, характерных для микроорганизмов перифитона. **2.** Все выделенные в акватории Нефтегавани культуры бактерий и дрожжей способны использовать нефть и нефтепродукты в качестве единственного источника углерода и энергии. Однако дрожжи более активно растут на сырой нефти, а бактерии – на флотском мазуте и дизельном топливе.

1. Горбенко Ю. А. Экология морских микроорганизмов перифитона. – Киев: Наук. думка, 1977. – 252 с.
2. Горбенко Ю. А. Экология и практическое значение морских микроорганизмов. – Киев: Наук. думка, 1990. – 160 с.

3. *Дорошенко Ю. В.* Изучение микрофлоры в системах гидробиологической очистки / Тезисы IV Всеукраинской научно-практической конференции молодых ученых по проблемам Чёрного и Азовского морей «Понт Эвксинский – 2005» (24 – 27 мая 2005 г.). – Севастополь, 2005. – с. 48 – 49.
4. *Дорошенко Ю. В.* Микрофлора Нефтегавани Севастопольской бухты (Чёрное море) // Морск. экол. журн. – 2005. – Отд. вып. № 1. – С. 33 – 37.
5. *Дорошенко Ю. В.* Морские дрожжи как компонент систем гидробиологической очистки морской среды / «Фундаментальные исследования важнейших проблем естественных наук на основе интеграционных процессов в образовании и науке»: тез. докл. международн. научн. конф. (19 – 24 августа 2006 г.). – Севастополь, 2006. – С. 125 – 126.
6. *Квасников Е. И., Щелокова И. Ф.* Дрожжи. Биология. Пути использования. – Киев: Наук. думка, 1991. – 326 с.
7. *Миронов О. Г.* Микробиологическая индикация нефтяного загрязнения морской среды / Методы исследования органического вещества в океане. – М.: Наука, 1980. – С. 275 – 283.
8. *Миронов О. Г., Дорошенко Ю. В.* Нефтеокисляющие дрожжи перифитона систем гидробиологической очистки морских вод // Морск. экол. журн. – 2007. (в печати).
9. *Миронов О. Г., Кирюхина Л. Н., Алёмов С. В.* Санитарно-биологические аспекты экологии севастопольских бухт в XX веке. – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2003. – 185 с.
10. *Миронов О. Г., Степанова О. А., Губасарян Л. А.* и др. Микромир в санитарно-биологических исследованиях. – Севастополь: Манускрипт, 1995. – 95 с.
11. *Практикум по микробиологии* / Под ред. Нетрусова А. И. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
12. *Протасов А. А.* Старые и новые проблемы исследования перифитона // Биология внутренних вод. – 2005. - № 3. – С. 3 – 11.
13. *Соловьева О. В.* Мидийное обрастание известняка и бетона в условиях полевого эксперимента // Фундаментальные исследования важнейших проблем естественных наук на основе интеграционных процессов в образовании и науке: тез. докл. международн. научн. конф. (19 – 24 августа 2006 г.). – Севастополь, 2006. – С. 63 – 64.
14. *Mironov O. G., Schekaturina T. L., Alyomov S. V., Osadchaya T. S.* Perspectives of using of marine polluted water cleaning hydrobiological method for sanitation and improvement of the coastal aquatoria state // Oil spills in the Mediterranean and Black Sea regions: Second Intern. Conf (Istanbul, 31st Oct.-3rd Nov. 2000). – Istanbul, 2000. – P. 187 – 195.

Институт биологии южных морей НАН Украины,
г. Севастополь

Получено 16.03.2007

J. V. DOROSHENKO

MICROFLORA IN ZONE OF HYDROBIOLOGICAL CLEANING SYSTEMS' LOCATION

Summary

The data on number and biochemical peculiarities of periphyton bacteria and seawater in the zone of hydrobiological cleaning systems' location are given. Microorganisms number in periphyton in 100 – 10000 times higher, as compared to their number in seawater. The bacteria number in water under the wave influence is increased in 10 – 100 times. All selected cultures of bacteria and yeasts grew on oil and oil products.