

Л.Л.Смирнова, Н.А.Андреева, Л.С.Антонова,  
А.Г.Мисюра, В.В.Гурик, В.М.Пичугин

*Институт прикладных проблем физики и биофизики НАН Украины, г.Киев*

**АКТИВНОСТЬ МИКРОФЛОРЫ  
КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ТОКСИЧНОСТИ МОРСКИХ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ  
ШЕЛЬФОВОЙ ЗОНЫ ЧЕРНОГО МОРЯ И КЕРЧЕНСКОГО ПРОЛИВА**

Изучена потенциальная активность донной микрофлоры в местах утечки остатков химических токсикантов, затопленных в период Второй Мировой войны XX в. Отмечены особенности восстановления жизнедеятельности микрофлоры при различных уровнях загрязнения донных отложений мышьяком и хлорированными органическими сульфидами. Полученные результаты перспективно использовать при оценке экологического состояния донных отложений в загрязненных прибрежных акваториях.

Экологическое состояние донных осадков украинского шельфа Черного и Азовского морей по химическим и биологическим характеристикам многие авторы считают напряженным [1 – 3]. В рамках работ по экологической безопасности шельфа Украины Институт прикладных проблем физики и биофизики НАН Украины и НИЦ «Государственный Океанариум» (г.Севастополь) проводят систематическое изучение состояния морского дна с помощью водолазов. В результате таких исследований в прибрежных акваториях Крыма и Керченского пролива найдены локальные участки, загрязненные остатками химических токсикантов [4]. Химические отравляющие вещества классов  $\beta$ -хлорированных органических сульфидов и As-органических соединений были затоплены в специальных металлических контейнерах в период Второй мировой войны XX в. В результате разрушения контейнеров, смесь химических соединений, образовавшаяся при контакте токсикантов с морской средой, попадала в донные отложения и придонные слои воды. Эти соединения токсичны для морской флоры и фауны [5] и вызывают изменения в численности основных групп морских микроорганизмов [6].

Донная микрофлора – ее распределение, численность, видовое и биохимическое разнообразие – определяет направление и интенсивность трансформации органических соединений [7]. От метаболизма микроорганизмов зависит уровень минерализации органического вещества и доступность образующихся продуктов (углеродсодержащих соединений и неорганических соединений азота, фосфора, кремния) для микроводорослей и разнообразных групп бентосных животных. При неблагоприятных экологических условиях возможно уменьшение численности и видового разнообразия донных микроорганизмов, что может привести к снижению буферной емкости грунта [8] и уменьшению генетического фонда биоценозов [9].

Нами изучена активность донной микрофлоры в местах захоронения остатков химических токсикантов и в условно чистых донных отложениях с целью последующего использования полученных результатов для ранжирования донных отложений по уровню загрязнения токсикантами.

© Л.Л.Смирнова, Н.А.Андреева, Л.С.Антонова,  
А.Г.Мисюра, В.В.Гурик, В.М.Пичугин, 2005

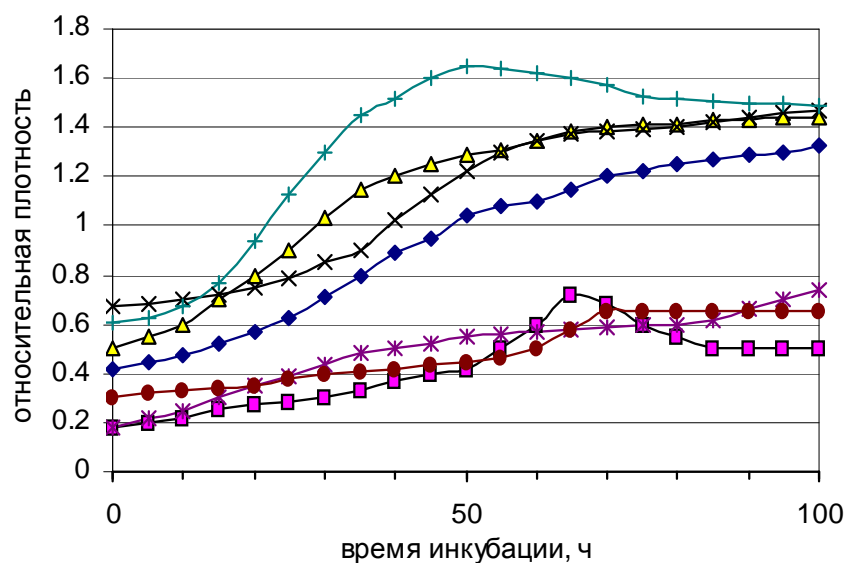
**Материалы и методы.** Микробиологические исследования проводили с пробами морских донных отложений, отобранными при помощи водолаза в местах утечки из разрушенных контейнеров остатков химических токсиантов. Поверхностный слой отложений глубиной 2 – 4 см отбирался в специальные стерильные герметичные цилиндры. Подводные поисковые работы и отбор проб проводили в прибрежных акваториях крымского побережья Черного моря и Керченского пролива в летне-осенние сезоны (с мая по сентябрь) 2003 – 2004 гг. Исследовано 7 проб донных отложений, загрязненных хлорорганическими сульфидами (соединения класса  $\beta$ -хлорированных органических сульфидов), 4 пробы отложений, загрязненных As-органическими соединениями и 9 проб условно-чистых донных отложений.

Состояние микробных ценозов донных отложений оценивали по численности и активности доминирующих физиолого-биохимических групп микроорганизмов. Количество микроорганизмов определяли методом предельных разведений по Мак-Креди [10]. Для микробиологических работ использовали жидкие, полужидкие и плотные среды: мясо-пептонный бульон (МПБ) (аммонифицирующие гетеротрофные микроорганизмы, адаптированные к азотсодержащим органическим веществам), белково-агаровую (1 : 1) среду (гетеротрофные микроорганизмы), среду Эшби с добавлением маннита (азотобактер и азотфиксирующие микроорганизмы); среду Виноградского (микроорганизмы, окисляющие неорганические формы азота); среду Сорокина (денитрифицирующие микроорганизмы); среду Старки (тионовые бактерии), Чапека (морские грибы и микроорганизмы актиномицетной линии). Все питательные среды готовили на отфильтрованной морской воде. Просмотр посевов суспензий донных отложений проводили после инкубации при температуре 27 °С в течение 20 сут.

Изучение процессов роста и деления клеток природных популяций микроорганизмов (потенциальную биохимическую активность) проводили на микробиологическом микроанализаторе *BIOSCREEN* (*LKB*, Финляндия) с использованием программы *BIORTN*. Прибор позволяет в стерильных условиях проводить инкубацию и непрерывное измерение оптической плотности инокулятов в каждой из 200 ячеек микроплашки типа «соты». Кривые роста микроорганизмов в каждой из питательных сред строились в координатах: оптическая плотность (биомасса) – время инкубации (100 ч). Соотношение суспензии грунта (0,1 – 0,5 г грунта в 10 мл стерильной морской воды) и питательной среды в ячейке 1 : 10, общий объем инокулята в ячейке 0,33 мл, количество параллельных проб от 3 до 5.

В донных отложениях определяли содержание As спектрофотометрически после окисления 2 – 5 мл суспензии донного осадка смесью (1 : 1) концентрированных серной и азотной кислот и суммарное содержание серы ( $\Sigma S$ ) после окисления всех форм серы до сульфат-ионов и последующего осаждения сульфат-ионов хлористым барием [11].

**Результаты и их обсуждение.** В морских осадках прибрежных акваторий развивается микрофлора с разнообразными физиолого-биохимическими свойствами. На рис.1 приведены кривые роста основных групп микроорганизмов, участвующих в трансформации вещества донных отложений в районе г.Керчь.

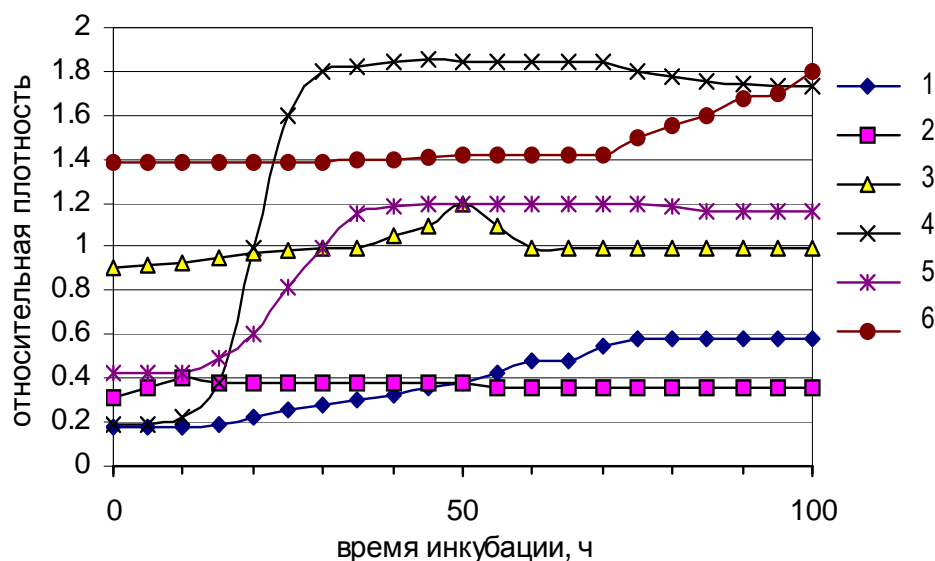


Р и с . 1 . Кривые роста потенциально активных групп микроорганизмов в донных отложениях прибрежной акватории (г. Керчь): морские грибы и актиномицеты (1); нитрифицирующие (2 фаза) (2); гетеротрофные на белково-агаровой среде (3); денитрифицирующие (4); тионовые (5); нитрифицирующие (1 фаза) (6); аммонифицирующие (7).

По кривым роста можно отметить, что в преобразовании органического вещества участвуют разнообразные группы сапрофитной микрофлоры. В осадках потенциально активны аэробные аммонифицирующие, гетеротрофные и денитрифицирующие микроорганизмы, морские грибы и актиномицеты (рис.1, кривые 1, 3, 4, 7). Наиболее вероятная численность перечисленных групп микроорганизмов достигает  $1,4 \cdot 10^7$ ;  $7,7 \cdot 10^5$ ;  $1,5 \cdot 10^6$  и  $1,1 \cdot 10^4$  кл/г сухого грунта соответственно. Одновременно с разрушением органического вещества сапрофитной микрофлорой, в исследованном биотопе активны автотрофные бактерии 1 и 2 фаз нитрификации (рис.1, кривые 2, 6), окисляющие аммонийный азот до нитритной и нитратной форм.

В донных отложениях, загрязненных остатками химических токсикантов на основе  $\beta'$ -хлорированных органических сульфидов, содержание  $\Sigma S$  возрастает до 10 – 12 %. Накопление в донных отложениях смеси токсикантов, образовавшихся в течение шестидесятилетнего контакта  $\beta'$ -хлорированных органических сульфидов с морской водой, не лимитирует развитие аммонифицирующей гетеротрофной микрофлоры. В исследуемых грунтах активны микроорганизмы, адаптированные к высокой концентрации азотсодержащего органического вещества (рис.2, кривая 4).

Численность этой физиологической группы микроорганизмов достигает  $2,8 \cdot 10^8$  кл/г сухого грунта. Следует отметить хороший рост в соответствующих питательных средах денитрифицирующих, тионовых бактерий (рис.2, кривые 5, 6) и морских грибов, жизнедеятельность которых также связана с трансформацией органического вещества. До 50 % морских грибов, отмеченных на среде Чапека, представлены мицелиальными формами.



Р и с . 2. Кривые роста потенциально активных групп микроорганизмов в донных отложениях, загрязненных хлорированными органическими сульфидами: азотфиксирующие (1); нитрифицирующие (2 фаза) (2); нитрифицирующие (1 фаза) (3); аммонифицирующие (4); денитрифицирующие (5); тионовые (6).

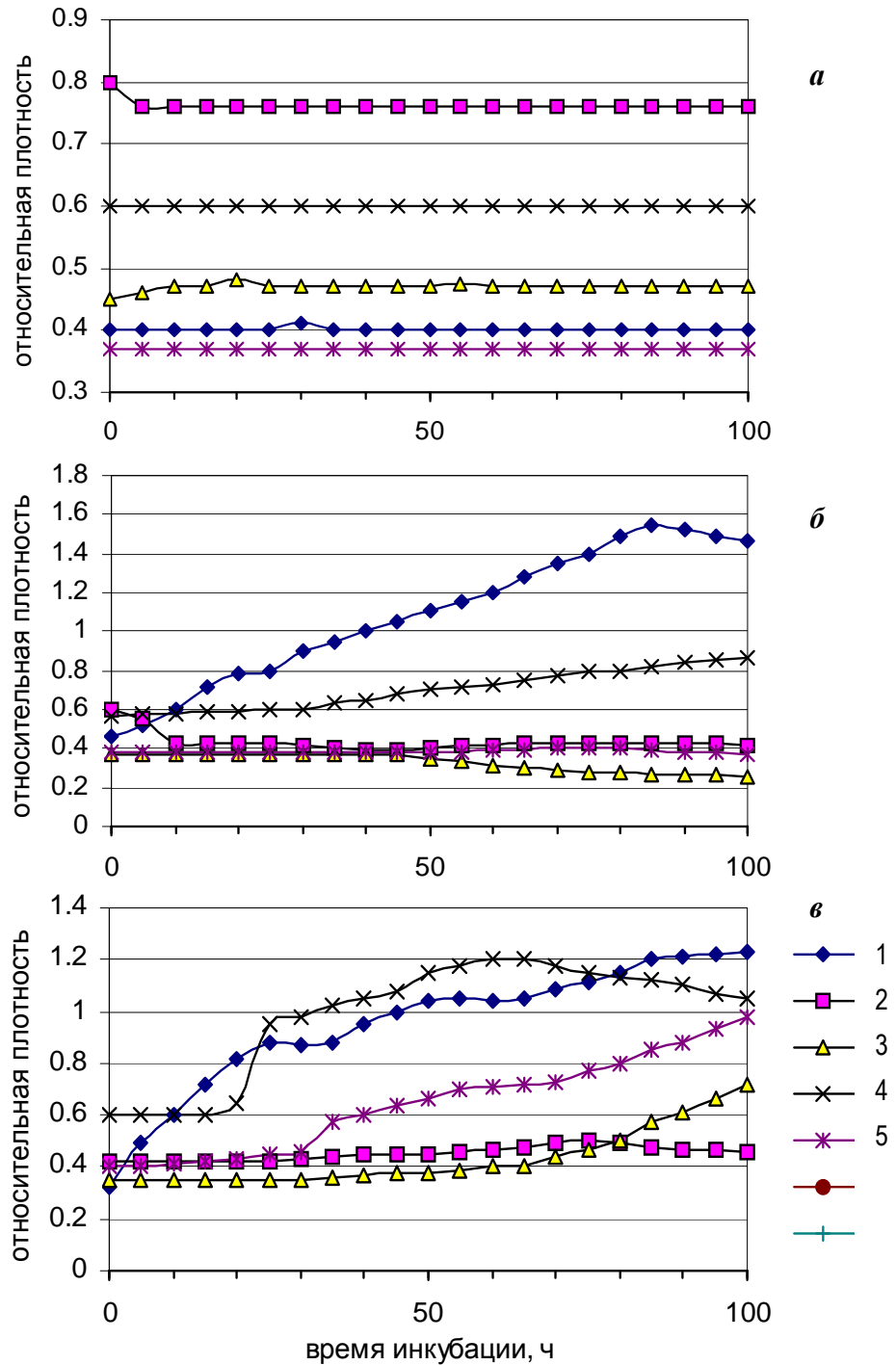
Сопоставление ростовых характеристик микрофлоры условно чистых и загрязненных хлорированными органическими сульфидами донных отложений позволяют отметить нарушения в микробиологическом цикле азота. Из различных групп микроорганизмов, осуществляющих цикл неорганического азота, в загрязненных осадках потенциально активны только азотфиксаторы (рис.2, кривая 1). Бактериального роста на инокулированных средах Виноградского для 1 и 2 фаз нитрификации не наблюдалось. В местах утечки из разрушенных контейнеров токсикантов на основе  $\beta'$ -хлорированных органических сульфидов цикл азота прерывается на стадии нитрификации, что упрощает спектр потребляемых микрофлорой форм азота. По-видимому, основным источником азота, необходимого для жизнедеятельности микрофлоры загрязненных хлорированными органическими соединениями отложений, служит аммонийная форма, образующаяся в процессе метаболизма аэробных аммонифицирующих групп донных микроорганизмов.

Морские грунты, загрязненные остатками химических токсикантов на основе As-органических соединений, представлены тонкодисперсными отложениями красно-коричневого цвета. В поверхностном слое таких отложений содержание As достигает 6 – 8 %. Отмеченная нами концентрация As в 1000 – 5000 раз превышает фоновое содержание этого химического элемента в прибрежных донных отложениях Черного и Азовского морей, приведенное в [12]. Микробиологические исследования таких отложений показали, что смесь As-содержащих соединений оказывает значительный биологический эффект на донную микрофлору. В исследованных грунтах угнетены даже наиболее устойчивое звено микробного ценоза – бактерии. При инкубировании питательных сред, инокулированных As-содержащими дон-

ными осадками, не наблюдалось увеличения численности и биомассы клеток микроорганизмов (рис.3, *a*). Однако дальнейшие экспериментальные работы показали, что в таких отложениях сохранилась жизнеспособная микрофлора. Наиболее толерантной к действию соединений *As* оказалась аммонифицирующая гетеротрофная микрофлора. Опытным путем установлена гранично-допустимая концентрация *As* в донных отложениях, при которой еще наблюдается активность аммонификаторов. Эта величина не должна превышать 0,06 – 0,08 % (600 – 800 мг *As*/кг суспензии донного осадка). При уменьшении содержания *As* в суспензии донных отложений до 0,06 – 0,08 % наблюдался рост аммонифицирующих гетеротрофных микроорганизмов как на обогащенной, так и на обедненной питательными веществами средах (рис.3, *b*, кривая 1). Плотность клеток этой физиологической группы микроорганизмов не превышала  $5,0 - 8,0 \cdot 10^3$  кл/мл суспензии, что намного меньше, чем количество таких же микроорганизмов, обнаруженных в донных отложениях, загрязненных хлорированными органическими сульфидами. При дальнейшем снижении содержания *As* в донных отложениях до 0,006 – 0,008 % (60 – 80 мг/кг суспензии донного осадка) спектр активных физиологических групп расширился. Наблюдался рост не только гетеротрофной микрофлоры, но и морских грибов, актиномицетов, тионовых и денитрифицирующих бактерий (рис.3, *b*, кривые 1, 3, 4, 5). Однако рост микрофлоры на простых по составу средах для узкоспециализированных групп микроорганизмов – нитрификаторов 1 и 2 фаз, азотфиксирующих микроорганизмов, нами не отмечен.

**Заключение.** Подводные работы по поиску и идентификации затопленных контейнеров с остатками химических токсикантов заканчиваются детоксикацией источников загрязнения морской среды. Для этого Институтом прикладных проблем физики и биофизики НАН Украины разработан и успешно используется метод подводного омоноличивания разрушенных контейнеров с химическими отравляющими веществами [4]. Отмеченные нами особенности в последовательности восстановления жизнедеятельности донной микрофлоры перспективно использовать для контроля надежности детоксикации затопленных остатков химических токсикантов. Переживать стресс и восстанавливаться после ослабления действия соединений *As* (при содержании *As* менее 0,06 – 0,08 %) способна, в первую очередь, сапрофитная микрофлора на МПБ и белково-агаровой среде, затем начинают проявлять активность морские грибы, денитрифицирующие и тионовые бактерии. В местах утечки хлорорганических сульфидов в донных отложениях возрастает содержание  $\sum S$  до 10 – 12%, что благоприятно для роста активности и численности тионовых бактерий, но угнетает процесс нитрификации (1 и 2 фазы).

В условно чистых донных отложениях восстанавливается активность узкоспециализированных групп микроорганизмов (нитрификаторов 1 и 2 фаз, азотфиксаторов). На таких участках морского дна создаются условия для жизнедеятельности различных групп бактерий, обеспечивающих полную минерализацию органического вещества. Тестирование морских донных отложений вокруг саркофага с химическими токсикантами по ростовым характеристикам основных физиологических групп микроорганизмов, позволит оце-



Р и с . 3 . Кривые роста жизнеспособной микрофлоры в донных отложениях, загрязненных соединениями As, содержание As: (а) 8 %; (б) 0,06 – 0,08 %; (в) 0,006 – 0,008 %. аммонификаторы (1); нитрификаторы (1 фаза) (2); тионовые (3); морские грибы и актиномицеты (4); денитрификаторы (5).

нить не только надежность изоляции токсикантов, но и полноту восстановления экологического благополучия на локальных участках морского дна.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Тихоненкова Е.Г., Тихоненков Э.П.* Предварительная оценка экологического состояния донных осадков морской береговой зоны Украины // Экологічні проблеми Чорного моря: Зб. матер. до 5-го Міжнар. Симпозіуму. 15-18.10 2003 р., Одеса.– Одеса: ОЦНТЕШ, 2003.– С.231-233.
2. *Еремеев В.Н., Иванов В.А., Ильин Ю.П.* Океанографические условия и экологические проблемы Керченского пролива // Морской экологический журнал.– 2003.– 3.– С.27-40.
3. *Терентьев А.С.* Состояние донного сообщества акватории внешнего рейда в Керченском проливе в 2003 г. // Мат. первой межд. Научн.-практ. конф. молодых ученых «Комплексные исследования биологических ресурсов южных морей и рек». 7-9.07 2004 г.– Астрахань, 2004.– С.193-196.
4. *Антонова Л.С., Гурик В.В., Місюра А.Г., Билявський Г.О.* Екологічні проблеми знешкодження хімічних токсикантів, затоплених в морській економічній зоні України // Екологічні проблеми Чорного моря: Зб. матер. до 4-го Міжнар. Симпозіуму. 31.10-1.11 2002 р., Одеса / Одеськ. центр наук.-техніч. та економічн. інформ. Под ред. Мінічевой Г.Г., Каца Б.М.– Одеса: ОЦНТЕШ, 2002.– С.23-27.
5. *Gamts S.A.* Disposing of chemical weapons: a desired end in search of an acceptable means // Environ. Prof.– 1989.– 11, № 4.– P.279-290.
6. *Smirnova L., Antonova L., Andreeva N., Misura A., Gurick V.* Chemical and microbial degradation of the military poisons matter in the Black Sea sediments // 30<sup>th</sup> Pacem in Maribus: Inter. Conf. 27-30.10 2003, Kiev.– Kiev, 2003.– P.123-124.
7. *Wijsman J.W.M.* Early diagenetic processes in northwestern Black Sea sediments.– Proefschrift, Department of Ecosystem Studies Netherlands Institute of Ecology, 2001.– 119 p.
8. *Grant J., Emerson C.* Resuspensions and stabilization of sediments with microbial biofilms: Implications for benthic-pelagic coupling // Biostabilization of Sediments. Eds. W.E.Krumbein, D.M.Paterson, L.J.Stal.– Olgenburg, 1994.– P.121-135.
9. *Абдрашитова С.А., Айткельдиева С.А., Абдуллина Г.Г. и др.* Влияние ртутного загрязнения на биоразнообразии гетеротрофных бактерий // Вісник Одеського нац. університету.– 2001.– 6, вип.4.– С.8-11.
10. *Аникиев В.В., Лукомская К.А.* Руководство к практическим занятиям по микробиологии.– М.: Просвещение, 1977.– 128 с.
11. *Унифицированные методы анализа вод /* Под ред. Лурье Ю.Ю.– М.: Химия, 1973.– 374 с.
12. *Рябинин А.И., Шibaева С.А., Орадовский С.Г.* Некоторые макро- и микроэлементы в донных отложениях северо-восточного региона Черного моря // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное использование ресурсов шельфа.– Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2004.– вып.10.– С.144-160.

Материал поступил в редакцию 1.03.2005 г.  
После доработки 27.04.2005 г.