

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

медьсодержащих **БИОЦИДОВ** на МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ микроорганизмов сообщества обрастания Севастопольской бухты ЧЕРНОГО МОРЯ

Проведена качественная и количественная оценка метаболической активности сообщества микроорганизмов обрастания в Черном море. Изученные сообщества выращивались на нейтральных (стекло, канифоль), малотоксичных (нафтенат меди) и токсичных (противообрастающая краска ЯН-7А) поверхностях в разное время года. Возраст экспериментальных сообществ составлял от 10 до 70 сут. Оценивались следующие параметры изучаемых сообществ: биомасса сообщества обрастания, его влияние на pH воды, уровень поглощения или выделения углеводов, азотсодержащих веществ (с учетом численности микроорганизмов) и суммарного растворенного органического вещества. Показано, что изученные медьсодержащие биоциды мало влияют на метаболизм сообщества микрообрастания.

Что касается наблюдаемых различий в метаболизме исследованных сообществ, они объясняются возрастом сообщества микрообрастания, а также сезонной динамикой.

Введение

Одним из важнейших методов защиты судов и гидротехнических сооружений в настоящее время является покрытие их противообрастающими красками, содержащими токсичные для гидробионтов соединения меди.

Известно, что развитие сообщества обрастания начинается с появления микрообрастателей, представленных, в первую очередь, бактериями и диатомовыми водорослями. Появление в составе такого сообщества макроорганизмов происходит значительно позднее. При этом одним из важнейших факторов, определяющих динамику выделения

Ю.Л. Ковальчук*,
кандидат
биологических наук,
старший научный
сотрудник,
Учреждение
Российской академии
наук Институт
проблем экологии
и эволюции
им. А.Н. Северцова
РАН (ИПЭЭ РАН)



биоцида в окружающую среду, а значит и эффективности работы противообрастающего покрытия, является взаимодействие материала покрытия и сообщества микроорганизмов обрастания. Результатом такого обоюдного взаимодействия являются изменения в метаболизме микроорганизмов, которые влияют на механизм работы противообрастающего покрытия. Несмотря на то, что механизмы этих процессов активно изучаются [1-3], многие аспекты остаются пока невыясненными. Их выяснение имеет большое значение для разработки качественного и количественного состава противообрастающих покрытий, а также прогнозирования эффективности и продолжительности их действия в тех или иных условиях.

* Адрес для корреспонденции: wtc-karpov@rambler.ru

Таким образом, целью настоящей работы является изучение влияния различных медьсодержащих биоцидов, применяемых в составе противообрастающих красок, на метаболическую активность сообщества микроорганизмов.

Материалы и методы исследования

Материалом для настоящей работы послужило сообщество микроорганизмов, которое образовалось на стеклянных пластинах размерами 9 × 9 см, помещенных в воду на глубину 1,0-1,5 м в Севастопольской бухте Черного моря. Опытные пластины покрывались веществами, обладающими различной степенью токсичности по отношению к обрастателям. Эти вещества условно подразделялись на следующие группы: нейтральные субстраты – стекло (контроль) и канифоль; малотоксичные субстраты – нафтенат меди; токсичные субстраты – термопластичная краска (ТПК) ЯН-7А, содержащая в качестве биоцида 25 % закиси меди.

Изучались сообщества, образовавшиеся при экспонировании пластин в течение 10, 20, 30, 40, 50, 60 и 70 сут. в разное время года (наблюдения проводились на протяжении годового цикла). Сообщества микроорганизмов, сформировавшиеся на контрольных (стекло) и опытных (канифоль, нафтенат меди, ЯН-7А) пластинах помещались в экспериментальные сосуды емкостью 250 мл с морской водой. Продолжительность экспонирования составляла 2 ч при температуре, соответствующей температуре воды в Севастопольской бухте на глубине 1,0-1,5 м во время проведения опыта.

Метаболическая активность микроорганизмов сообщества обрастания оценивалась по скорости поглощения или выделения метаболитов в морскую воду с учетом биологических характеристик сообщества. При этом на экспериментальных пластинах определялось количество гетеротрофных бактерий и диатомовых водорослей (представлено в логарифмической форме), а также биомасса сообщества микроорганизмов (представлена в г сухой массы/см²). Определялись также следующие характеристики морской воды в опытных сосудах после экспонирования в них сообществ микроорганизмов: значение pH; концентрация растворенных органических веществ (РОВ) по методике [4]; концентрация нингидринположительных веществ (НПВ), аммония и углеводов по методике [5]. Полученные данные обрабатывались мето-

О.П. Полтаруха,
кандидат
биологических наук,
старший научный
сотрудник,
Учреждение
Российской академии
наук Институт
проблем экологии
и эволюции
им. А.Н. Северцова
РАН (ИПЭЭ РАН)

дами математической статистики с помощью программы Statistica 6.

Результаты и их обсуждение

Как свидетельствуют наши данные (рис. 1), численность гетеротрофных бактерий в воде Севастопольской бухты на протяжении годового цикла (учитывались среднемесячные показатели) имеет четыре максимума: позднеосенний (апрель – май), летний (июль – август) и два зимних (декабрь и февраль).

Численность диатомовых водорослей имеет только три максимума (рис. 1). Второй зимний максимум у них отсутствует. Остальные

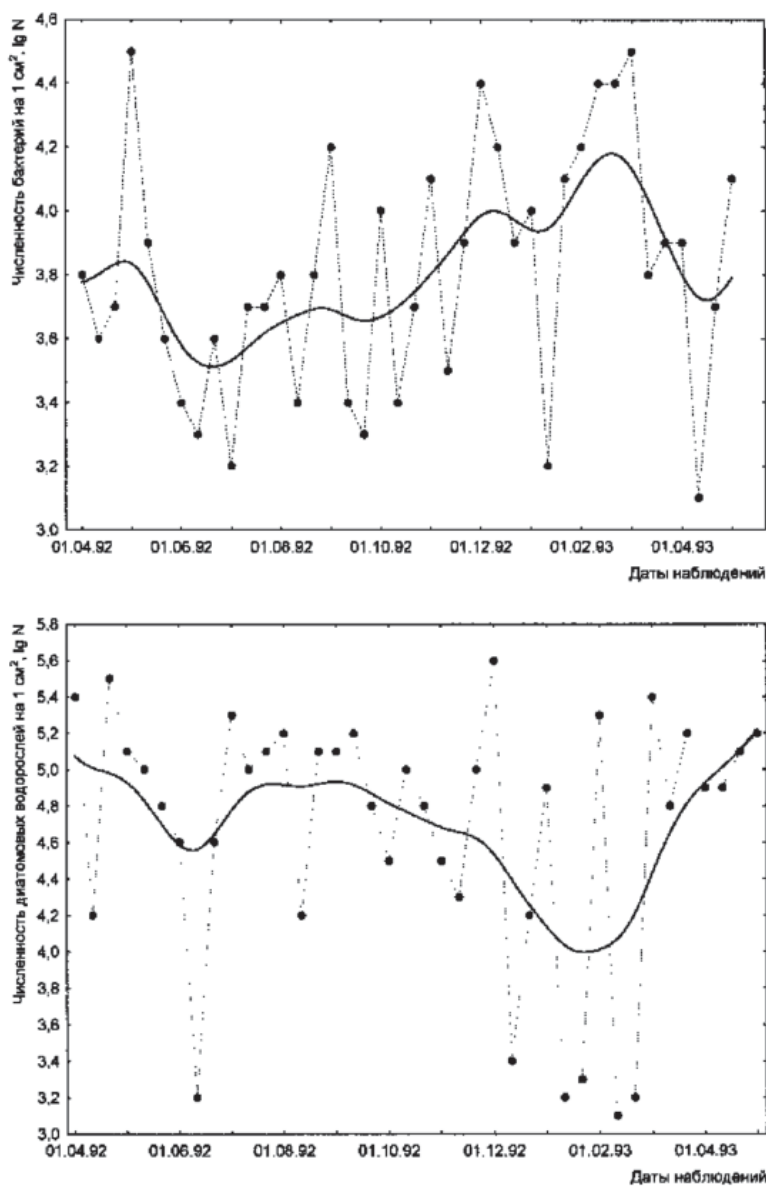


Рис. 1. Годовая динамика численности бактерий и диатомовых водорослей в сообществе обрастания, сформировавшемся на нейтральной (стекло) поверхности в Севастопольской бухте.

максимумы наблюдаются в те же сроки, что и для гетеротрофных бактерий.

Что касается значения рН воды, то в его динамике можно различить весенне-зимний и небольшой летний максимумы (рис. 2), соответствующие по времени максимумам концентрации бактерий и диатомовых водорослей. В начале октября прослеживается отчетливо выраженный минимум рН, а с конца октября до апреля его значение практически монотонно возрастает.

Концентрация РОВ в воде обнаруживает те же максимумы, несколько смещенные по времени (рис. 2). При этом наибольшая концентрация РОВ наблюдается в мае – первой половине июня. Летний максимум концентрации РОВ выражен значительно слабее и сдвинут на август – сентябрь, а единственный слабо выраженный зимний максимум приходится на декабрь – январь.

Динамика отдельных компонентов, составляющих РОВ (рис. 3), несколько отличается от суммарной динамики РОВ. Так, в чередовании максимумов углеводов не удалось выделить какой-либо закономерности. Эти максимумы наблюдались в апреле – мае, июле, сентябре и ноябре. В содержании аммония и НПВ отчетливо выражены весенний (май) и осенний (ноябрь) максимумы. Кроме того, динамика концентрации НПВ обнаруживает также более слабо выраженные максимумы в сентябре и в марте.

Рассмотрим теперь изменения состава морской воды, вызываемые 2-х часовым экспонированием в ней сообщества микроорганизмов, содержащего преимущественно бактерии и диатомовые водоросли. При этом в зависимости от сезона наблюдается более или менее интенсивное потребление РОВ, о чем свидетельствует снижение его концентрации (рис. 4).

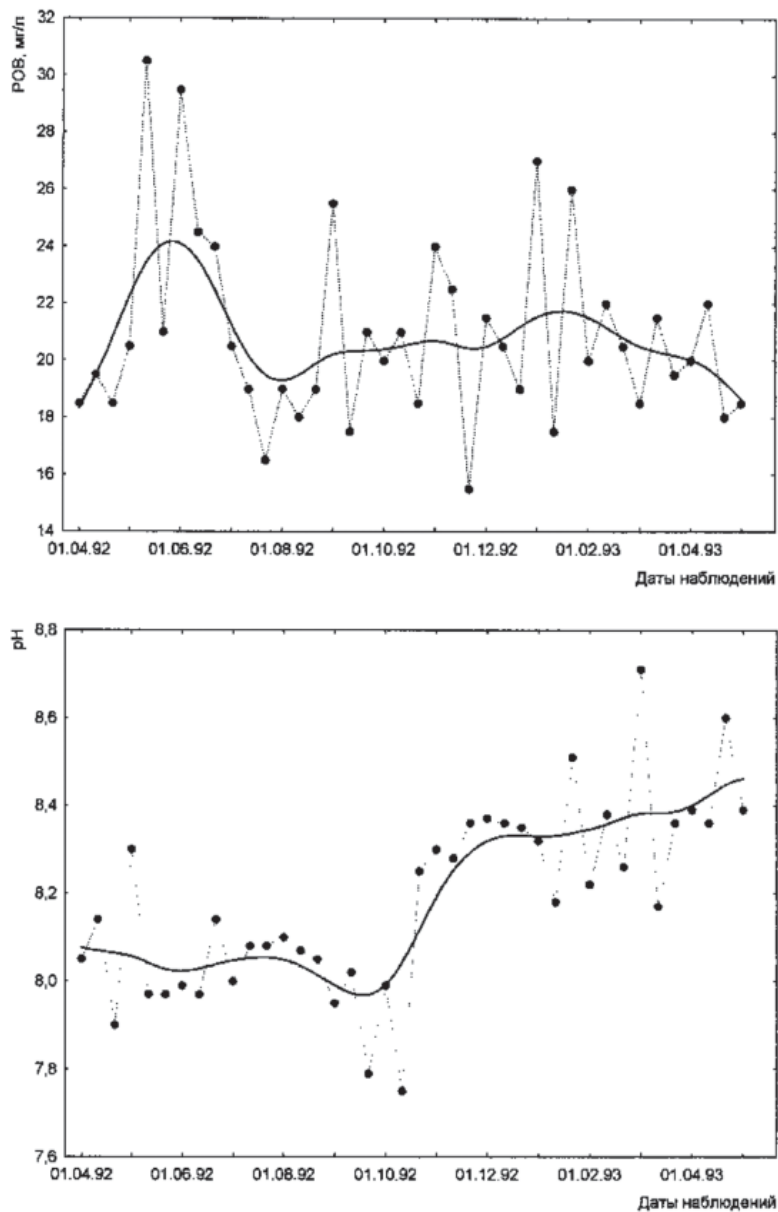


Рис. 2. Годовая динамика концентрации РОВ и значения рН воды в Севастопольской бухте.



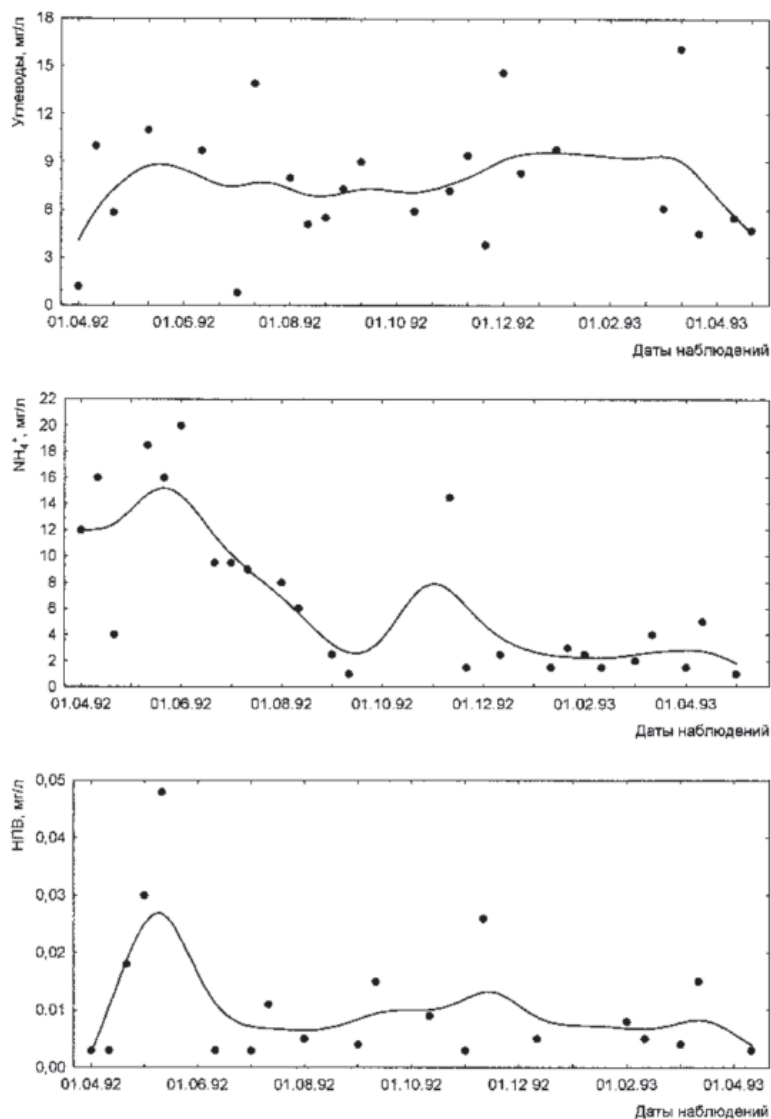


Рис. 3. Годовая динамика концентрации углеводов, аммония и НПВ в воде Севастопольской бухты.

Данный рисунок характеризует сообщество, выращенное на нейтральной поверхности (стекло). Для аналогичных сообществ, выращенных на канифоли, нафтенате меди и краске ЯН-7А, наблюдается сходная картина. Следует отметить, что на протяжении всего годового цикла максимумы поглощения РОВ совпадают с максимумами увеличения рН, то есть потребление органических веществ сопровождается подщелачиванием среды. Снижение показателя рН наблюдается с ноября по февраль, а также в апреле, то есть, в основном, в холодный период года, и свидетельствует о том, что жизнедеятельность сообщества микроорганизмов в это время сопровождается выделением в среду кислых продуктов обмена.

Рассмотрим теперь динамику поглощения и выделения сообществом микроорганизмов азотсодержащих веществ. Общая закономерность заключается в том, что органический азот в составе НПВ, как правило, выделяется микроорганизмами, а неорганический азот в форме аммония – потребляется (рис. 5). При этом наиболее интенсивно поглощение аммония и выделение НПВ происходит в весенне-летний период. Литературные данные о потреблении и выделении свободных аминокислот, составляющих основную часть НПВ, полученные с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, свидетельствуют о тесной взаимосвязи этих двух процессов и высокой скорости оборота в море свободных аминокислот. Эта величина составляет в летний период около получаса при концентрации свободных аминокислот в морской воде порядка нескольких нмолей [6].



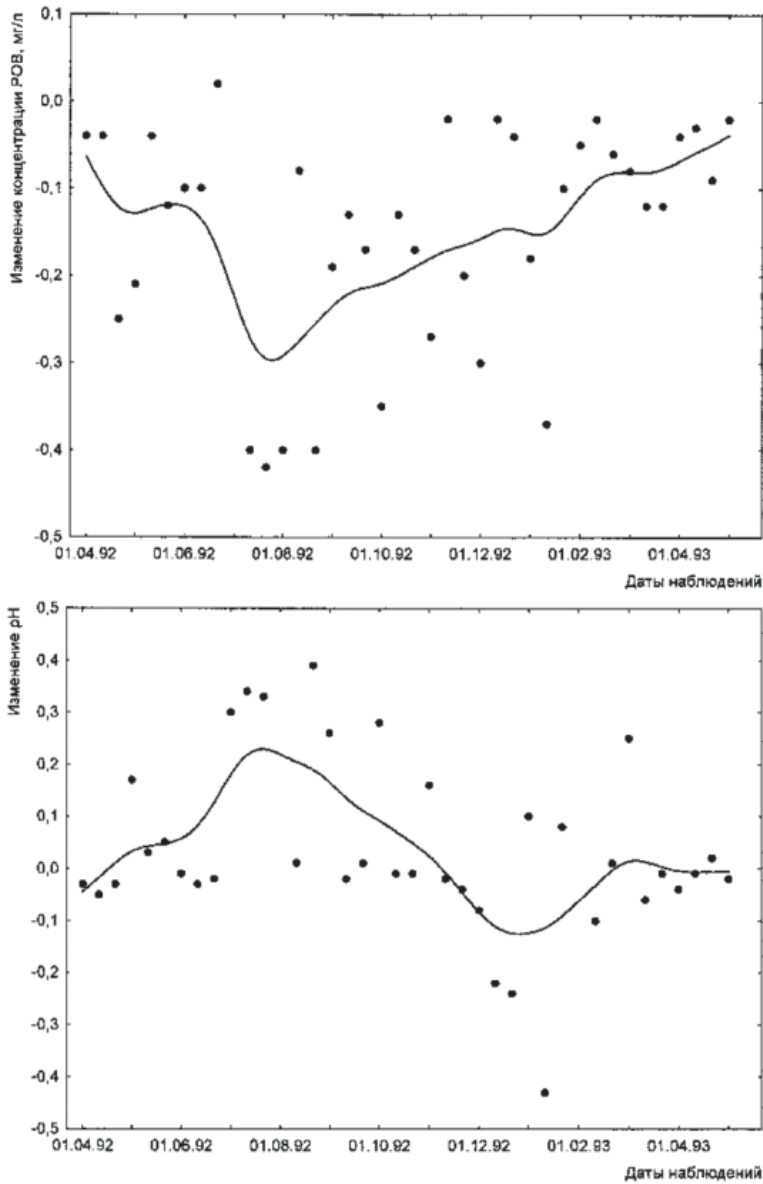


Рис. 4. Изменение содержания РОВ и значения рН в экспериментальном сосуде под влиянием жизнедеятельности сообщества обрастания, сформировавшемся в течение месяца на стеклянной пластине в воде Севастопольской бухты.

Как показал опыт, воздействие медьсодержащих биоцидов на процессы потребления аммония невелико. Видно (рис. 5), что динамика этого процесса у сообщества, выращенного на нейтральной поверхности (стекло) и на токсичной краске ЯН-7А практически совпадает. Что касается выделения другого азотсодержащего продукта – НПВ, то медьсодержащие биоциды влияют на этот процесс довольно странным образом. Если при экспозиции сообщества, выращенного на нейтральном субстрате, наблюдается увеличение в воде содержания НПВ, то при экспозиции сообщества, выращенного на субстрате с медьсодержащим биоцидом, количество НПВ убывает. Аналогичная динамике НПВ тенденция прослеживается и при сравнении выделения и поглощения углеводов при экспозиции сообществ, выращенных на стекле и на краске ЯН-7А (рис. 5).

Таким образом, сообщества микробрастания, выросшие на нейтральных и медьсодержащих токсичных субстратах, обнаруживают заметное сходство в динамике метаболических процессов. При этом сообщество, как правило, поглощает из внешней среды углеводы и аммоний, а выделяет НПВ. В то же время скорость и даже направление процессов метаболизма в значительной степени зависит от возраста сообщества обрастания (табл. 1 и 2).



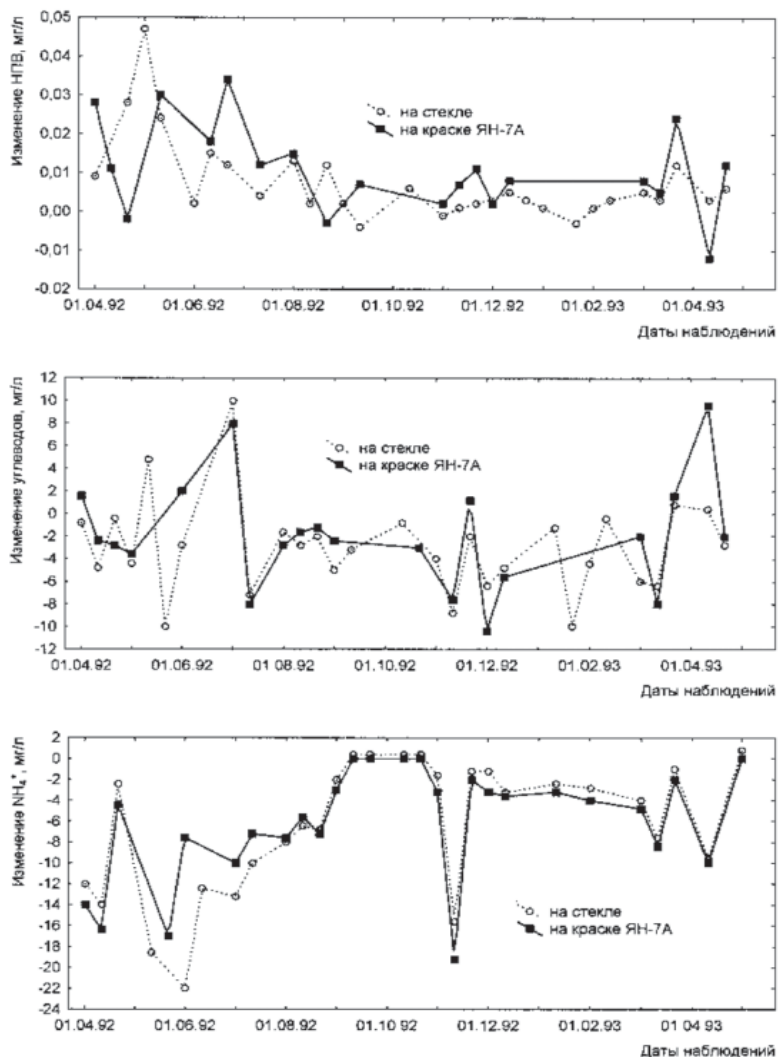


Рис. 5. Изменение содержания НПВ, углеводов и аммония в экспериментальном сосуде под влиянием жизнедеятельности сообщества обрастания, сформированном в течение месяца на нейтральной (стекло) и токсичной (краска ЯН-7А) поверхности в воде Севастопольской бухты.

Как свидетельствуют результаты наших опытов, наиболее высокой активностью обладает 10-суточное сообщество, а уже при достижении им возраста 20-30 сут. интенсивность метаболизма в пересчете на 1000 клеток гетеротрофов падает в несколько раз (табл. 3). В дальнейшем происходят значительные изменения структуры и видового состава сообщества обрастания. На поверхности нетоксичных субстратов, в сравнении с медьсодержащими, уже начиная с 40 сут. появляются первые особи макрообрастателей – усоногих раков, мшанок, мидий, гидридов, асцидий. Соответственно, происходят значительные изменения метаболизма такого сообщества. Так, например, поглощение углеводов сменяется их выделением. Испытанные нами субстраты заметно различались по количеству развивающихся на них гетеротрофных бактерий. Наиболее интенсивно заселялись поверхности, покрытые канифолью и краской ЯН-7А (табл. 1 и 2). В то же время, как указывалось выше, значительных различий в процессах метаболизма

Таблица 1

Изменения концентрации метаболитов в воде опытных сосудов после 2-часового экспонирования сообществ микрообрастания, сформированных на нейтральных субстратах

Дата	Возраст сообщества обрастания, сут.	Количество гетеротрофов, кл/см ²	Концентрация метаболитов, мкг/мл		
			Аммоний	Углеводы	НПВ
Стекло					
22.02	10	$2,8 \times 10^2$	-8,60	0	+0,008
28.02	20	$3,0 \times 10^3$	-5,20	-3,00	+0,011
11.03	30	$1,5 \times 10^4$	-6,65	-7,00	+0,014
20.03	40	$3,8 \times 10^3^*$	-1,84	+2,30	+0,013
28.03	50	$4,7 \times 10^3^*$	–	–	–
10.04	60	$9,8 \times 10^3^*$	-7,54	+2,44	+0,001
22.04	70	$4,8 \times 10^3^*$	0	+1,00	+0,060
Канифоль					
22.02	10	$6,7 \times 10^3$	-4,56	-5,00	+0,006
28.02	20	$2,3 \times 10^4$	+0,04	-0,50	+0,022
11.03	30	$1,6 \times 10^4$	-6,41	-9,55	0
20.03	40	$7,1 \times 10^5$	-1,60	+5,50	+0,011
28.03	50	$8,5 \times 10^5$	–	–	–
10.04	60	$9,8 \times 10^5$	-7,46	-7,44	-0,007
22.04	70	$1,0 \times 10^6$	+0,18	+4,40	+0,044

Примечание: * – появление единичных особей мшанок и усоногих раков; – поглощение метаболитов; + – выделение метаболитов; прочерк означает отсутствие данных.



Таблица 2

Изменения концентрации метаболитов в воде опытных сосудов после 2-часового экспонирования сообществ микрообращения, сформировавшихся на токсичных и малотоксичных субстратах

Дата	Возраст сообщества, сут.	Количество гетеротрофов, кл/см ²	Концентрация метаболитов, мкг/мл		
			Аммоний	Углеводы	НПВ
Нафтенат меди					
22.02	10	$5,8 \times 10^3$	-4,60	-5,00	0
28.02	20	$5,1 \times 10^3$	0	-0,20	+0,004
11.03	30	$6,2 \times 10^3$	-6,33	-5,50	0
20.03	40	$1,1 \times 10^4$	-1,84	+1,00	+0,022
28.03	50	$2,3 \times 10^3$	–	–	–
10.04	60	$9,2 \times 10^3$	-7,50	-7,00	+0,008
22.04	70	$1,4 \times 10^4$	–	–	–
Краска ЯН-7А					
22.02	10	$6,7 \times 10^3$	-4,28	-9,00	+0,009
28.02	20	$2,3 \times 10^3$	0	-0,80	+0,002
11.03	30	$1,6 \times 10^3$	-6,50	-8,50	0
20.03	40	$7,1 \times 10^4$	-1,36	+1,00	+0,022
28.03	50	$8,5 \times 10^4$	–	–	–
10.04	60	$9,8 \times 10^4$	-7,70	-7,42	-0,011
22.04	70	$1,0 \times 10^4$	0	+2,64	+0,012

Примечание: – поглощение метаболитов; + выделение метаболитов; прочерк означает отсутствие данных.

Таблица 3

Скорость выделения (+) или поглощения (-) метаболитов сообществом микрообращения разного возраста, образовавшимся на разных субстратах в пересчете на 1000 клеток гетеротрофов, февраль – апрель

Возраст сообщества, сут.	Стекло	Канифоль	Нафтенат меди	Краска ЯН-7А
Аммоний, мкг/мл				
10	-25,36	-1,03	-1,19	-3,55
20	-1,73	-0,01	-0,42	-0,19
30	-0,44	-0,40	-1,02	-0,37
Углеводы, мкг/мл				
10	-13,46	-0,75	-0,95	-0,26
20	-1,00	-0,24	-0,21	-0,10
30	-0,47	-0,60	-0,03	-0,09
Нингидринположительные вещества, нг/мл				
10	+28,57	+0,90	+0,86	+4,50
20	+3,67	+0,96	+0,78	+1,43
30	+0,93	+0,21	+0,34	+0,11



у сообществ микрообращения, выросших на разных субстратах, обнаружено не было. При этом обнаруживаются сравнительно высокие скорости метаболизма сообщества, развивавшегося на стеклянных пластинах. На канифоли – другой испытанной нейтральной поверхности – интенсивность метаболизма сообщества оброста хорошо сопоставима с таковой на медьсодержащих токсичных субстратах – нафтенате меди и краске ЯН-7А. У 10-суточного сообщества на ЯН-7А метаболические процессы были даже в 3-4 раза более интенсивными, чем у такого же сообщества на канифоли. Таким образом, испытанные нами биоциды мало влияют на скорость обмена веществ у бактерий.

Заключение

Анализ литературы, посвященной данному вопросу, позволяет предполагать, что наблюдаемое явление обусловлено наличием на поверхности клеток бактерий центров связывания металлов [7]. Показано, что наибольшим сродством к этим центрам обладает ион меди. Кроме того, выделяемые бактериями во внешнюю среду органические вещества также связывают двухвалентные ионы меди с образованием комплексных медьорганических соединений. С увеличением pH способность бактериальных клеток связывать ионы меди увеличивается [8]. Таким образом, противообрастающие покрытия, изготовленные на основе медьсодержащих биоцидов, не препятствуют заселению субстрата микроорганизмами. При этом различия в скорости метаболических процессов у бактерий, выросших на нейтральных и ток-



сичных медьсодержащих поверхностях, относительно невелики. Изменения численности микроорганизмов в сообществе обрастания связаны с возрастом сообщества, а также с сезоном.

Литература

1. Горбенко Ю.А. Влияние морских бактерий на работу термопластичных противообрастающих красок (ТПК) в море / Ю.А. Горбенко, Ю.Л. Ковальчук // Экология моря. 1982. Вып. 9. С. 84-88.
2. Горбенко Ю.А. Влияние слизистой пленки микроорганизмов на выделение биоцидов противообрастаемой краской / Ю.А.

Ключевые слова:

Черное море, микрообрастание, медьсодержащие биоциды, метаболическая активность

Горбенко, Л.Л. Смирнова // Экология моря. 1987. Вып. 25. С. 85-88.

3. Чердынцева Л.М. Влияние солей тяжелых металлов на эффективность усвоения бактериопланктоном растворенного органического вещества / Чердынцева Л.М., Вирцавс М.В. // Экспериментальная водная токсикология. 1986. № 11. С. 161-167.

4. Горбенко Ю.А. Экология морских микроорганизмов перифитона. Киев: Наукова думка, 1977. 252 с.

5. Таможняя В.А. Внешний азотистый и углеводный метаболизм микросообщества перифитона и взвеси / В.А. Таможняя, С.А. Горомосова // Экология моря. 1988. Вып. 29. С. 18-25.

6. Fuhrman J. Close coupling between release and uptake of dissolved free amino acids in seawater studied by an isotope dilution approach // Marine Ecology Progress Series. 1987. V. 37, № 1. P. 45-52.

7. Gonsalves M.L.S. Metall ion binding by biological surfaces: voltammetric assessment in the presence of bacteria / M.L.S. Gonsalves, L. Sigg, M. Reutlinger, W. Stumm // Science of Total Environment. 1987. V. 60. P. 105-119.

8. Maurice C.G. Biomass and compositional changes in the periphytic community of an artificial stream in response to lowered pH / C.G. Maurice, R.L. Lowe, T.M. Burton, R.M. Stanford // Water Air and Soil Pollutions. 1987. V. 33, № 1-2. P. 165-177.



Yu.L. Kovalchuk, O.P. Poltarukha

COPPER-CONTAINING BIOCIDES INFLUENCE ON THE METABOLIC ACTIVITY OF MICROFOULING COMMUNITY IN SEVASTOPOL BAY, THE BLACK SEA

The qualitative and quantitative estimation of the metabolic activity of the Black Sea microfouling communities has been carried out. The studied microfouling communities have been grown over the non-toxic (glass, colophon), little-toxic (copper naphthenate) and toxic (antifouling paint «YaN-7A») surfaces during different seasons. The experimental communities were from 10 to 70 days old. The

following parameters of the studied communities have been estimated: a fouling community biomass, the influence of the experimental community on the water pH, the uptake/release level of the carbohydrates, nitrogen-containing substances (in view of the microorganism quantity) and the total dissolved organic matter. The copper-containing biocides were shown to have the little influence on the microfouling

community metabolism. As for the observed differences in the experimental community metabolism, they are explained by the differences in the age of a fouling community and also by seasonal dynamics.

Key words: the Black Sea, microfouling, copper-containing biocides, metabolic activity