

УДК 574.583.576.8(264.3)

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА И ЧИСЛЕННОСТЬ ГЕТЕРОТРОФНОГО БАКТЕРИОПЛАНКТОНА В РАЙОНЕ АНТАРКТИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ АКАДЕМИК ВЕРНАДСКИЙ

В.П. Чекалов

Институт биологии южных морей НАН Украины, 99011, г. Севастополь, пр-т Нахимова, 2, valch@mail.ru

Реферат. В период зимовки 2009-2010 гг. на Украинской антарктической станции Академик Вернадский были изучены сезонные колебания численности гетеротрофных бактерий и потребления кислорода в прибрежных водах о-ва Галиндез, различающихся по степени антропогенного воздействия. Соотношение психрофильных форм относительно мезофильных изменялось в широком диапазоне за счёт случайного поступления аллохтонной микрофлоры, главным образом от теплокровных животных и человека. В относительно чистой зоне среднегодовое значение достигло 32%, тогда как в двух прилегающих к станции точках оно составило 5,9 и 19,7%. Суточное потребление кислорода колебалось в пределах 0,21–0,97 мг/л и коррелировало в большей мере с численностью психрофильной микрофлоры (+0,835). Экспериментально показано, что в районах повышенного антропогенного давления температурный фактор влияет на темпы связывания кислорода более существенно, чем дополнительное обогащение водной среды органикой. Тем не менее сезонные флуктуации численности гетеротрофных бактерий и потребления кислорода связаны со вспышками активности фитопланктона, продуцирующего значительное количество органического вещества.

Сезонна динаміка споживання кисню та чисельність гетеротрофного бактеріопланктону в районі Української антарктичної станції Академік Вернадський. В.П. Чекалов

Реферат. Під час зимівлі 2009-2010 рр. на Українській антарктичній станції Академік Вернадський було вивчено сезонні коливання чисельності гетеротрофних бактерій та споживання кисню у прибережних водах о. Галіндез, що різнилися за ступенем антропогенного впливу. Процентне співвідношення психрофільних форм відносно мезофільних змінювалось у широкому діапазоні за рахунок випадкового потрапляння аллохтонної мікрофлори, головним чином від теплокровних тварин та людини. У відносно чистій зоні середньорічне значення досягло 32%, тоді як на двох прилеглих до станції точках воно становило 5,9 та 19,7%. Добове споживання кисню коливалось у межах 0,21–0,97 мг/л і сильніше корелювало з чисельністю психрофільної мікрофлори (+0,835). Експериментально показано, що в районах підвищеного антропогенного тиску температурний фактор впливає на темпи зв'язування кисню більше, аніж додаткове збагачення органікою водного середовища. Тим не менш сезонні флуктуації чисельності гетеротрофних бактерій та споживання кисню пов'язані зі спалахами активності фітопланктону, який продукує значну кількість органічної речовини.

Seasonal dynamics of oxygen consumption and of heterotrophic bacterioplankton number in the region of the Ukrainian antarctic station Academician Vernadskiy. V.P. Chekalov.

Abstract. Seasonal fluctuations of heterotrophic bacteria abundance as well as of oxygen consumption in coastal waters near island Galindez varied by levels of anthropogenic influence were investigated during wintering 2009-2010 at the Ukrainian Antarctic station Academician Vernadsky. The percentage of psychrophilic forms to mesophilic due to casual ingress of allochthonic microflora, mainly from warm-blooded animals and human, was changing in a wide range. Its annual average in a relatively pure zone reached 32%, whereas it has reached 5,9 and 19,7% in two points near the station. Daily consumption of oxygen fluctuated within limits of 0,21–0,97 mg/l and it correlated more vastly with of psychrophilic microflora number (+0,835). It is shown experimentally, that the temperature factor influences rates of using

oxygen more, than additional enrichment of the water environment by organic matter in areas of increased antropogenic pressure. Nevertheless, seasonal fluctuations of the number of heterotrophic bacteria and of biochemical oxygen consumption are connected to flashes of phytoplankton activity, producing considerable quantity of organic matter.

Key words: psychrophilic and mesophilic heterotrophic bacteria, biochemical oxygen demand, Antarctica

1. Введение

По гетеротрофной активности бактериопланктон в водах Антарктики почти в 7 раз превышает зоопланктеров (Самышев, 1983). Максимальная продукция бактерий в поверхностном слое сопряжена со стадией затухающей фотосинтетической активности фитопланктона и возрастанием относительного вклада вторичной продукции бактерий, которая в среднем для поверхностного слоя доходит до 52% от первичной продукции (Серёгин, 2003).

На Украинской антарктической станции Академик Вернадский начиная с 7-й экспедиции (2002-2003 гг.) регулярно осуществлялся мониторинг состояния фитопланктона, общей численности и продукции бактериопланктона. Однако наблюдения за сезонными изменениями численности и физиологической активности гетеротрофной составляющей бактериопланктона, одной из характеристик которой может служить биохимическое потребление растворённого кислорода (БПК), не велись.

Известно о существенном снижении темпов роста бактерий при +10 °С и ниже (Bott, 1975; Novitsky et al., 1977). Так, В.И. Романенко (1985) отмечал, что при низкой температуре воды (+4 °С) динамика прироста численности микроорганизмов сильно растянута во времени. Экспериментально доказано (Юдин, 2007), что в каждом случае культивирования разное, иногда довольно значительное, число бактерий будет находиться в жизнеспособном, но некультурабельном состоянии (ЖНС). Oliver et al. (1995) исследовали переход в ЖНС клеток *Vibrio vulnificus*, помещенных в естественные эстуариевые воды, в течение зимних и летних месяцев. Клетки, инокулированные в мембранные диффузионные камеры, вступали в ЖНС состояние в январе и феврале, когда температура воды была низкой (в среднем <15 °С). Когда же клетки в состоянии ЖНС были помещены в те же условия в более теплое время года, с августа до ноября (приблизительно 21°С), бактерии подвергались быстрой, в пределах 24 ч, реверсии в культурабельное состояние. Это связано с тем, что у прокариотов для поддержания необходимого уровня метаболизма в различных условиях окружающей среды существуют механизмы активации дополнительных форм ферментов, сходных по функции, но отличающихся молекулярной массой и приспособленностью к различным температурам (Сомов и др., 1991). Ферменты, представленные только одной формой, не смогли бы осуществлять катализ в столь широком диапазоне температур.

В связи с этим для выявления активных в естественных условиях среды бактерий целесообразно культивирование посевов производить также не только при оптимальной температуре, но и при температуре, соответствующей данному месту обитания и времени года.

Величина БПК₅ в воде поверхностных водоёмов изменяется обычно в пределах 0,5–5,0 мг О₂/дм³ и склонна к сезонным и суточным колебаниям (Муравьёв, 2004). Если суточные флуктуации в природных условиях зависят в основном от соотношения интенсивности процессов продуцирования-потребления кислорода, то сезонные связаны преимущественно с изменением температуры и исходным содержанием растворённого кислорода. Что касается Антарктики, то эти параметры в течение года являются относительно стабильными. Согласно ранее проведённым исследованиям, водная толща в районе Аргентинского архипелага максимально насыщена кислородом, а в поверхностном слое зачастую наблюдается перенасыщение. Даже с глубиной его концентрация изменяется незначительно (Доценко и др., 1997; Артамонов и др., 2003).

Во время зимовки 2009-2010 гг. ставилась задача изучить соотношение численности психрофильных и мезофильных гетеротрофов с уровнем потребления кислорода в условиях хронически низких температур океанических вод Антарктики.

2. Материал и методы

Выбор точек микробиологического мониторинга был обусловлен особенностями региональной гидрологии, ледовой обстановкой, глубинами и доступностью, особенно в зимний период. В итоге остановились на трёх станциях в пределах районов, подверженных различному уровню антропогенного воздействия (таблица 1).

Таблица 1. Станции микробиологического контроля

№ станции	Координаты		Местонахождение	Характеристика
	Широта	Долгота		
1	65,2455 °S	64,2583 °W	Слип (Marina Point)	Периодический сброс пищевых отходов
4	65,2481 °S	64,242 °W	Мыс Пингвин-Пойнт (Pinguin Point)	Фоновая точка, удалённая от источников загрязнения
6	65,2462 °S	64,2576 °W	Пристань Джетти (Jetty)	Постоянный хозяйственный сток

Для учёта численности гетеротрофов пробы асептично отбирались из придонного слоя воды специально изготовленным батометром. Посев производили поверхностным способом, объёмом 0,4 мл в четырёх повторностях. В качестве питательной среды использовали стандартный мясо-пептонный агар (МПА), который готовили на кипячёной и профильтрованной морской воде. После подсушивания одну пару чашек инкубировали при температуре 20–21 °С, а другую – в холодильнике при 3–4 °С. Учёт в обеих группах производили ежедневно в течение 12 суток.

Параллельно с помощью оксиметра TLENOMIERZ № 5221 (Польша) с электродом Кларка определяли потребление кислорода. В лаборатории после ряда ополаскиваний пробу переносили в стерильную колбу на 100 мл с магнитной мешалкой внутри. С целью исключения попадания пузырьков воздуха погружение датчика в колбу и её герметизацию проводили под водяным затвором в ёмкости с водой. Уплотнение в горловине колбы достигалось за счёт резинового кольца, надетого непосредственно на электрод Кларка. При герметизации для выравнивания давления в колбе между стенкой горлышка и уплотнительным кольцом вставляли дренажный капилляр (игла от шприца), который после завершения процедуры извлекали прямо под водой. В зависимости от поставленных задач инкубацию осуществляли либо при температуре окружающей среды (в ванне с морской водой), либо в помещении при температуре 20–21 °С. Продолжительность инкубации составляла не менее 5 суток. Измерения повторяли каждые 12 часов, перемешав предварительно в течение 50 мин. содержимое колбы с помощью магнитной мешалки.

3. Результаты и их обсуждение

В океанических водах вблизи побережья Антарктиды, как правило, содержится очень малое количество гетеротрофных бактерий – менее 10 кл/мл. Их численность, однако, значительно возрастает в прибрежных водах вблизи островов, заселённых колониями пингвинов, доходя до 100 тыс. колоний/мл (Delille, 1987, 1990). В период зимовки 2009-2010 гг. концентрация сапрофитных бактерий колебалась в пределах 38–11 000 колоний/мл. Для вод Антарктики число колоний, выросших при +20 °С, вероятно, соответствует той

части микрофлоры, которая привнесена извне (человеком либо животными). В районах, испытывающих антропогенный пресс, этот показатель может существенно расходиться с численностью автохтонной микрофлоры, которая даёт рост при культивировании в температурном режиме, близком к данной среде обитания. Так, на рис. 1 видно, что на станциях 1 и 6, в той или иной мере подверженных воздействию человека, наблюдается достаточно большое различие в численности мезофильных и психрофильных гетеротрофов, тогда как на условно чистой ст. 4 это расхождение не столь значительно. Можно говорить, что чем оно шире, тем выше вероятность загрязнения акватории. Это, конечно, касается исключительно арктического и антарктического регионов, где температура водной толщи редко поднимается выше 3-4 °С и где полноценными хозяевами жизненного пространства являются психрофильные формы. Срок появления первых колоний при низких температурах культивирования в 2-3 раза более продолжителен и составляет обычно 5–7 суток против 1-2 в случае термостатирования посевов в мезофильных условиях. Этот интервал часто совпадает с началом более интенсивного потребления кислорода в опытах по определению БПК.

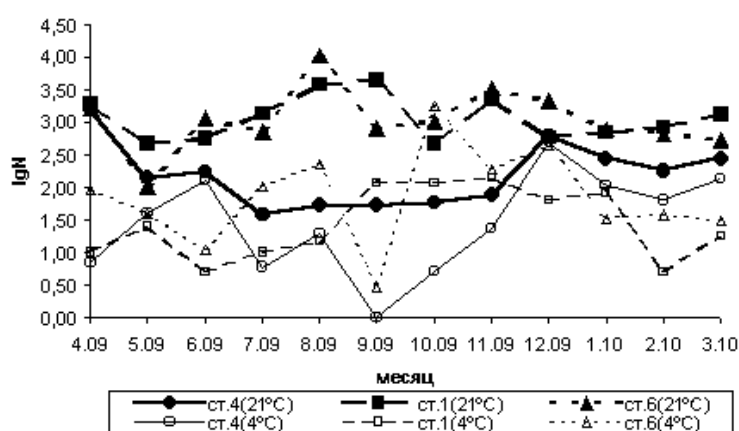


Рис. 1. Численность гетеротрофных бактерий в зависимости от температуры культивирования, lgN/мл.

Fig. 1. Abundance of heterotrophic bacteria depending on the temperature of thermostating, lgN/ml.

Процентное соотношение колоний, впервые обнаруженных визуально на чашках «холодной» инкубации, к численности мезофильных форм за тот же интервал времени отражает долю физиологически активных микробных клеток сообщества в природной среде. Это та часть микрофлоры, которая активно функционирует, и ей не требуется времени на адаптацию. То же соотношение, но уже через 10–12 суток, будет соответствовать потенциально возможной в данных температурных условиях активации клеток, которая определяется в первую очередь уровнем обеспеченности и доступности питательных веществ.

Для обозначения исходного и конечного значений этих коэффициентов температурной адаптации мы использовали символы $^tA_{исх}$ и $^tA_{кон}$, где t – температура культивирования посевов, соответствующая условиям среды в точке отбора пробы, т.е.

$$^tA_{исх. (кон.)} = \frac{N_4 \times 100}{N_{20}}$$

При этом N_4 – количество визуально различимых колоний гетеротрофов, либо впервые проявившихся (исх.), либо через 12 суток (кон.) культивирования посевов при 4 °С; N_{20} – то же, но при 20 °С соответственно.

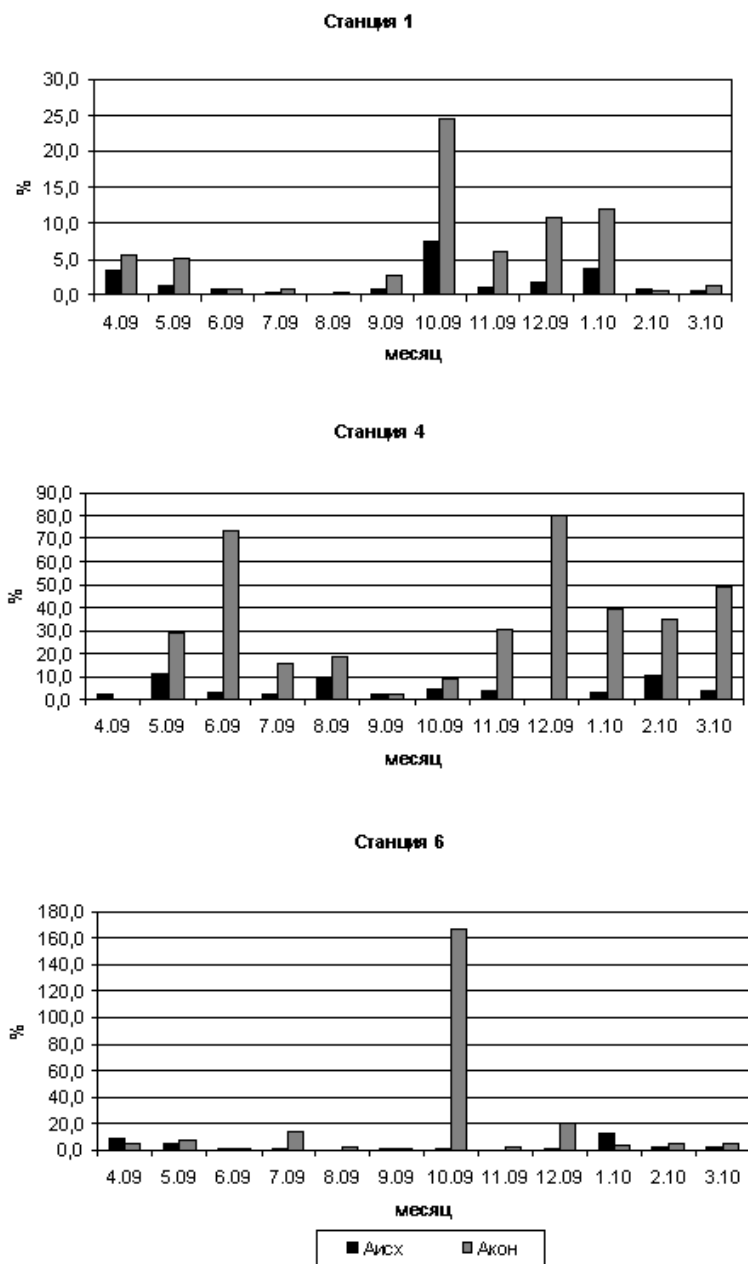


Рис. 2. Доля физиологически активной гетеротрофной микрофлоры при культивировании посевов в условиях, близких к температуре местообитания (4 °С).

Fig. 2. Physiologically active share of heterotrophic microbes in bacterial inoculations at the thermostating conditions corresponding to temperature of a habitat (4 °С).

Сезонные изменения этих коэффициентов на ст. 4 отличаются более высокими значениями долей как активных, так и потенциально способных к активации психрофильных гетеротрофов, максимальный уровень которых достигает 50 и 80% соответственно (рис. 2). На двух других станциях, испытывающих некоторое влияние антропогенного характера, они практически не превышают 20%, что, возможно, указывает на количественное доминирование привнесенной извне мезофильной составляющей на фоне относительно постоянной численности аборигенной микрофлоры.

Учитывая довольно ровный на протяжении года температурный режим в водах Антарктики, можно ожидать также и незначительного колебания БПК. Однако, как видно на диаграмме (рис. 3, крайние шесть столбцов справа на каждой станции), диапазон изменений этого параметра на станциях с различным уровнем антропогенной нагрузки (ст. 4 и ст. 1) достаточно широк. Ранее (Доценко и др., 1997) в этих точках, также при более высоких значениях БПК₅, отмечались довольно широкие пределы их варьирования – от 0,25 до 2,6 мг/л. Более умеренным, несмотря на самый высокий прессинг со стороны человека, выглядит колебание сезонных значений БПК на ст. 6. Возможно, действие именно хозяйственно-бытовых сбросов, и в частности поверхностно активных веществ, стабилизирует процессы биodeградации поступающей дополнительно органики. Данное предположение требует дополнительного исследования.

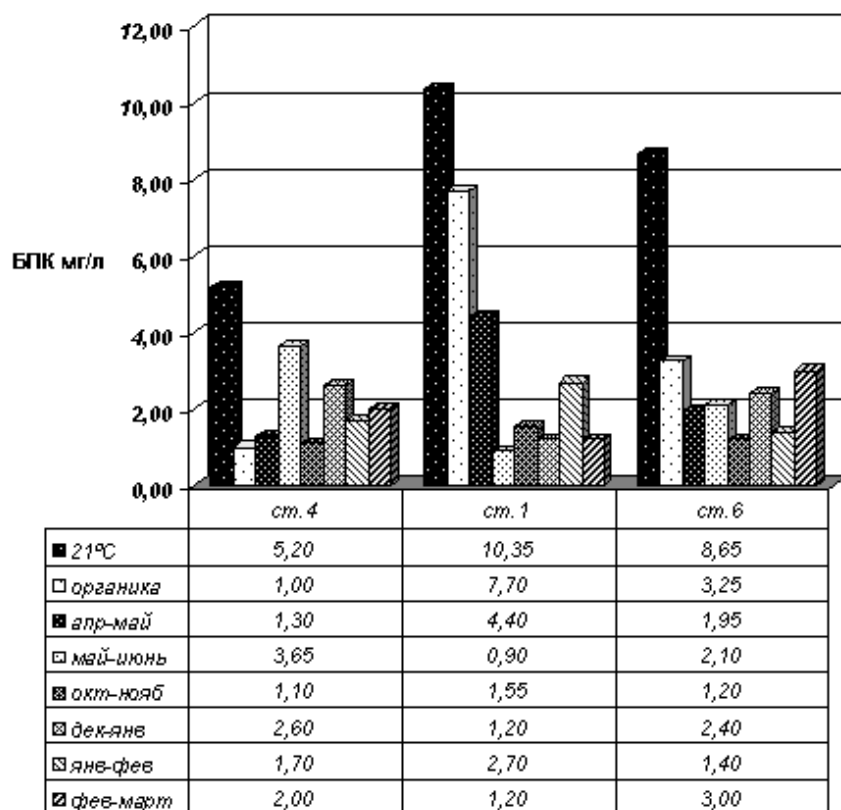


Рис. 3. Биохимическое потребление кислорода (БПК₅) в экспериментальных и природных условиях.

Fig. 3. Biochemical oxygen demand (BOD₅) in the experiment and in a nature.

В экспериментальных условиях потребление кислорода резко возрастает при повышении температуры инкубации до 20–21°C, особенно на станциях 1 и 6 (первые столбцы слева). Несколько меньший эффект наблюдался при добавлении в экспериментальную колбу легкодоступной органики в виде 1 мл 1% МПБ (мясо-пептонного бульона), что дополнительно повышало её концентрацию приблизительно на 0,1 мг/мл (вторые столбцы слева). Эксперимент в этом случае проводили в ванне с проточной морской водой при температуре окружающей среды. При этом на ст. 4 был зафиксирован весьма низкий уровень потребления кислорода. Станции 1 и 6 дали прирост БПК, но существенно меньше, чем это наблюдалось при повышении температуры инкубирования. Очевидно, органическое вещество не является лимитирующим фактором, что косвенно подтверждается высоким уровнем первичной продукции в этом регионе (Самышев, 2003).

Влияние температурного фактора, а тем более поступление дополнительных органических веществ значительно меньше сказывается на физиологической активности аборигенного бактериоценоза, чем той части микрофлоры, которая поступает в океан в результате хозяйственной деятельности человека. Можно сказать, что в конкретных климатических условиях последняя остаётся инактивированной, а основная роль по деструкции органики ложится на автохтонное бактериальное сообщество, функциональное состояние которого при этом практически не меняется. Подобные выводы делаются в ряде работ других авторов. Так, низкая температура воды и присутствие сырой нефти в прибрежных водах архипелага Кергелен (Земля Адели) не подавляли развитие бактерий (Cahetet et al., 1992). Не оказала значительного токсического воздействия на микробное сообщество прибрежных вод и авария танкера у антарктической станции Палмер (Karl, 1989).

На рис. 4, где графически сопоставлен характер сезонных изменений численности мезофильной и психрофильной групп бактерий со среднесуточным потреблением кислорода, видна сопряжённость этих показателей. Но если для ст. 1 коэффициент корреляции более значим у мезофилов (+0,698 против +0,363), то на фоновой станции 4 наблюдается сильная связь, достигающая +0,835, уже между изменениями БПК и численностью автохтонных бактерий, растущих при температуре 3–4 °С. Для мезофилов же коэффициент составляет здесь +0,573. Это также указывает на более активное состояние аборигенной микрофлоры, особенно в незагрязнённых районах Антарктики. Изменились природные условия в сторону повышения температуры, и дополнительное подключение мезофильной составляющей сможет ускорить процессы деструкции. В то же время удивляет тесная обратная связь, выявленная на ст. 6. Здесь коэффициенты корреляции для бактерий, растущих при 20–21°C и 3–4°C, составили –0,75 и –0,76, соответственно. Возможно, это связано, как отмечалось выше, с ингибирующим действием хозяйственных стоков.

В зависимости от категории водоёма регламентируется величина БПК₅: не более 3 мг О₂/дм³ для водоёмов хозяйственно-питьевого водопользования и не более чем 6 мг О₂/дм³ для водоёмов хозяйственно-бытового и культурного назначения. Для морей (I и II категории рыбо-хозяйственного водопользования) БПК₅ при 20 °С не должно превышать 2 мг О₂/дм³ (Косов и др., 1995). Таким образом, под разряд локально загрязнённых иногда попадают даже малодоступные для людей акватории в целом экологически чистой Антарктиды. В большинстве своём это связано с периодом бурного развития фитопланктона. Выявлено три пика в развитии фитопланктона: цветение в октябре *Phaeocystis pouchetii*, в ноябре-декабре – диатомовых с р. *Fragilariopsis*, *Achnanthes* и *Corethron*. Третий пик обусловлен массовым развитием в середине января флагеллят *Cryptomonas* sp., *Pyramimonas* sp. и мелких жгутиковых. К концу осени и началу антарктической зимы, когда вегетация фитопланктона постепенно затухает, численность растительных клеток в планктоне и их видовое разнообразие снижаются (Кузьменко и др., 2007). По нашим данным, в этот период наблюдалось некоторое возрастание численности психрофильных форм гетеротрофных бактерий на фоне относительно стабильного темпа потребления кислорода.

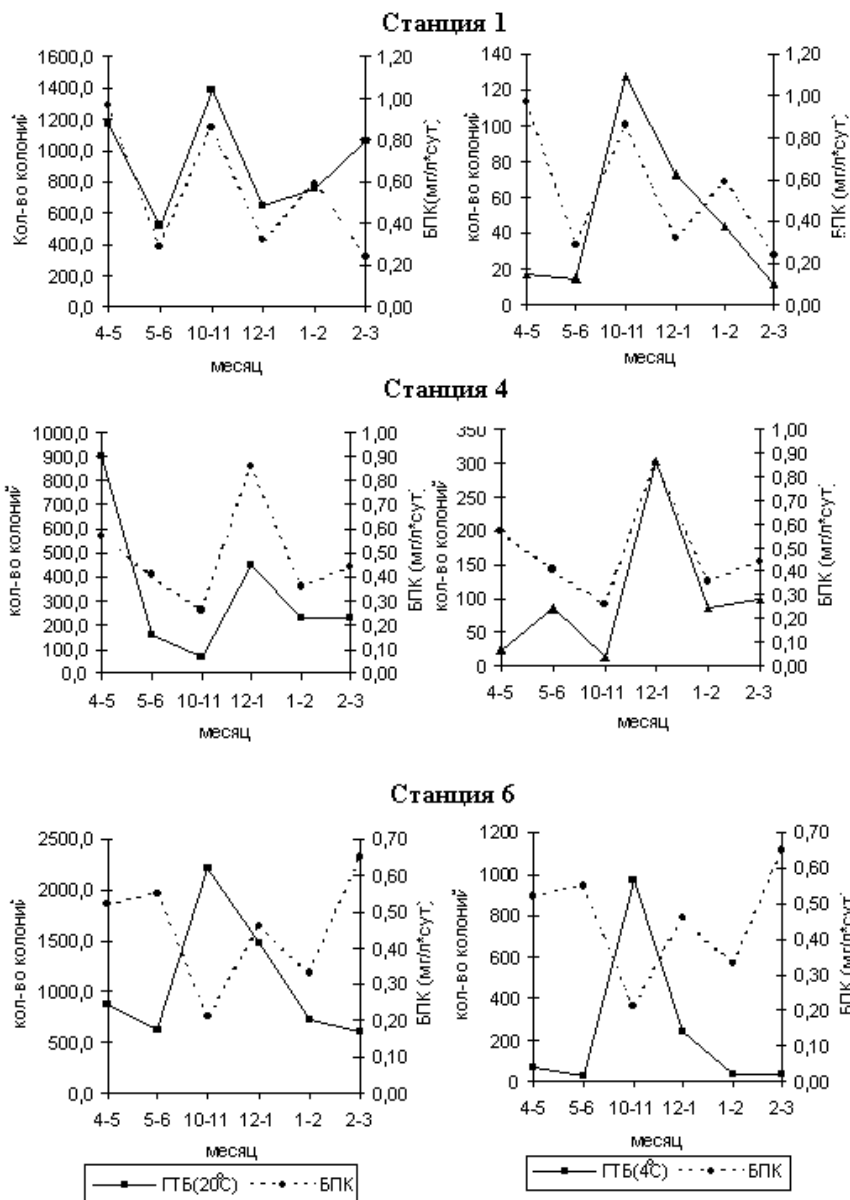


Рис. 4. Сезонные изменения численности мезофильных и психрофильных гетеротрофных бактерий (ГТБ) на фоне среднесуточного потребления кислорода (БПК).

Fig. 4. Seasonal changes of the number of mesophilic and psychrophilic heterotrophic bacteria (ГТБ) to daily average consumption of oxygen (БПК).

3. Выводы

В условиях низких температур вод Антарктики присутствие в составе бактериопланктона мезофильной микрофлоры может являться следствием внешнего

локального воздействия теплокровных животных, либо человека. Чем меньше на их фоне доля активных ($A_{исх.}$) и потенциально способных к активации ($A_{кон.}$) психрофильных форм, тем более значительно это влияние. В наиболее чистых районах они могут достигать 50 – 80%, причём большая часть этой микрофлоры находится именно в активном состоянии.

Потребление кислорода изменялось произвольно, сильнее коррелируя с численностью психрофильных бактерий. Дополнительное добавление легкодоступной органики в меньшей степени, чем повышение температуры инкубирования, влияло на темпы связывания кислорода.

Полученные значения БПК₅ позволяют отнести некоторые акватории в районе о. Галиндез к загрязненным. Однако это имеет место во время антарктического летне-осеннего периода и носит эпизодический характер.

Сезонные флуктуации, прежде всего, численности психрофильных гетеротрофных бактерий связаны со вспышками активности фитопланктона, продуцирующего значительное количество органического вещества.

БЛАГОДАРНОСТИ. Работа выполнена при поддержке Национального антарктического научного центра Министерства образования и науки Украины. Автор выражает признательность всему составу 14-й УАЭ; д.т.н. А.Б. Таширеву; д.б.н. Э.З. Самышеву. Особая благодарность за ежедневную помощь к.б.н. И.В. Дикому, а также к.б.н. М.Б. Гулину за поддержку и участие.

Литература

Артамонов Ю.В., Романов А.С., Внуков Ю.Л. и др. Особенности гидрологической и гидрохимической структуры вод в районе архипелага Аргентинские острова в феврале-марте 2002 г. // УАЖ. – 2003. – №1. – С. 17–24.

Доенко С.А., Рясинцева Н.И., Рязанова Л.Е. и др. Гидролого-гидрохимическая характеристика шхерного мелководья в районе Аргентинских островов // Бюл. УАЦ. К: 1997. – Вып. 1. – С. 141–148.

Косов В.И., Иванов В.Н. Охрана и рациональное использование водных ресурсов. Ч. 1. Охрана поверхностных вод: уч. пособие. – Твер. гос. техн. ун-т, 1995. – 124 с.

Кузьменко Л.В., Игнатъев С.М. Сезонная изменчивость количественного развития фитопланктона у Аргентинских островов (Антарктика) // Морський екологічний журнал. – 2007. – Т. VI, № 3. – С. 47–60.

Муравьев А.Г. Руководство по определению показателей качества воды полевыми методами. 3-е изд., доп. и перераб. – СПб.: «Крисмас+», 2004. – 248 с.

Романенко В.И. Микробиологические процессы продукции и деструкции органического вещества во внутренних водоемах. – Л.: Наука, 1985. – 295 с.

Самышев Э.З. Бактериопланктон и его продукция в Антарктических водах // Сырьевые ресурсы антарктической зоны океана и проблемы их рационального использования: Тез. докл. Всесоюз. науч. конф. (Керчь, 4-6 окт. 1983). – Керчь, 1983. – С. 132–133.

Серегин С.А., Брянцева Ю.В., Чмыр В.Д. Состояние микропланктонного сообщества (фито- и бактериопланктон) в осенний период на мелководье Аргентинских островов, Антарктика // УАЖ. – 2003. – №1. – С. 107–113.

Сомов Г.П., Варвашевич Т.Н., Тимченко Н.Ф. Психрофильность патогенных бактерий. – Новосибирск: Наука, 1991. – 204 с.

Юдин И.П. Современные подходы к оценке жизнеспособности бактерий с акцентом на феномене некультурабельности // Annals of Mechnicov Institute. – 2007. – №3. – С. 8–16.

Bott T.L. Bacterial growth rates and temperature optima in a stream with a fluctuating thermal regime // Limnol. Oceanogr. – 1975. – 20. – P. 191–197.

Cahet G., Delille D. La notion de bloom bacterien: Effects des hydrocarbures sur la croissance des micriflores bacteriennes antarctiques // Oceanis. – 1992. – Vol. 18, N 5. – P. 569–577.

Delille D. Spatial distribution of coastal Antarctic sea water bacteria: Relationship with avifauna // Polar. Biol. – 1987. – Vol. 8, N 1. – P. 55–60.

Delille D. Factors affecting the horizontal patchiness of coastal Antarctic seawater bacteria // Ibid. – 1990. – Vol. 11, N 1. – P. 41–45.

Karl D. M. Petroleum degradation by microorganisms: Initial results from the Bahia Paraiso oil spill // Ibid. – 1989. – Vol. 24, N 5. – P. 170–173.

Novitsky J. A., Morita R.Y. Survival of a psychrophilic marine *Vibrio* under long-term nutrient starvation // Appl. Environ. Microbiol. – 1977. – Vol. 33. – P. 635–642.

Oliver J., Hite F., McDougald D., Andon N., Simpson L. Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – Vol. 61. – P. 2624–2630.

Rollins D., Colwell R. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment // Appl. Environ. Microbiol. – 1986. – Vol. 52. – P. 531–538.