



УДК 551.35:579:628.5(262.5)

**Л. Л. Смирнова**, канд. биол. наук, ст. н. с., **Н. А. Андреева**, канд. биол. наук, ст. н. с.,  
**Л. С. Антонова**, гл. спец., **А. Г. Мисюра**, докт. биол. наук, **В. В. Гурик**, гл. инж., рук. по спец. работам

Институт прикладных проблем физики и биофизики Национальной академии наук Украины, Киев, Украина

### МИКРОФЛОРА МОРСКИХ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ В МЕСТАХ ЗАХОРОНЕНИЯ ОСТАТКОВ ХИМИЧЕСКОГО ОРУЖИЯ

Приведены результаты изучения жизнеспособной микрофлоры морских донных отложений в местах утечки из контейнеров, затопленных во Второй Мировой войне (XX век), соединений из класса  $\beta$ -хлорорганических сульфидов. Отмечена активность сапрофитной микрофлоры, микроорганизмов, разрушающих органические вещества в процессе тионового хемосинтеза и тиоденитрификации, ассоциаций азотфиксирующих бактерий. В донных отложениях возрастает содержание органического вещества до 36,5 – 44,2%, суммарное содержание серы достигает 10 – 15%, что в 50 – 100 раз выше, чем в условно чистых биотопах

**Ключевые слова:** Черное море, донные отложения, загрязнение,  $\beta$ -хлорорганические сульфиды, микроорганизмы

В течение последних лет в морской экономической зоне Украины проводится поиск и дезактивация остатков химического боезапаса (химических отравляющих веществ), затопленного в период Второй Мировой войны [3]. Такие работы приобретают все большую актуальность, поскольку специальные металлические контейнеры и толстостенные корпуса артиллерийских снарядов, заполненные химическими токсикантами, в результате морских коррозионных процессов разрушаются. Химические токсиканты проникают в донные отложения, взаимодействуют с морской средой, что приводит к изменению их физического состояния и химического состава. Однако контакт химических отравляющих веществ с морской водой, происходивший в течение шестидесяти лет, не уменьшает их токсичность (2 класс опасности, согласно ГОСТ 12.1.000.76), что отмечено в исследованиях [3].

В рамках экологической экспертизы, проводившейся Управлением программы химической демилитаризации, Окриджской национальной лабораторией и другими организациями США в конце 80-х годов XX века, было показано [10], что при попадании в воду токсикантов на основе  $\beta$ -хлорорганических сульфидов только 5 – 20 % веществ растворяется сразу (растворимость в воде  $\beta$ ,  $\beta'$ -дихлордиэтилсульфида 0,68 – 1,00 кг/м<sup>3</sup>). При контакте химического отравляющего вещества с морской средой образуются токсичные соединения различного состава, представляющие опасность для морской флоры и фауны. Установлено, что до 80 – 95 % этих токсикантов может включаться в пастбищные и детритные пищевые цепи в результате реакций комплексообразования и сорбции на поверхности живых и мертвых гидробионтов [11]. Однако информация о влиянии остатков химического боезапаса на основе хлорированных органиче-

ских сульфидов на численность и активность различных физиологических групп морских донных микроорганизмов в доступной литературе отсутствует.

В предлагаемой работе приведены результаты изучения жизнеспособной микрофлоры морских донных отложений в местах утечки из затопленных контейнеров соединения класса  $\beta$ -хлорорганических сульфидов ( $\beta$ ,  $\beta'$ -дихлордиэтилсульфида).

**Материал и методы.** Поиск затопленных контейнеров с остатками химического боезапаса проводился водолазами в шельфовой зоне крымского побережья Черного моря. Водолазы осматривали участок морского дна вокруг разрушенного контейнера, измеряли температуру на поверхности донных отложений ртутным термометром, защищенным металлическим кожухом, отбирали пробы придонной воды в полиэтиленовые емкости. Поверхностный слой донных отложений (глубиной до 3 – 4 см) водолазы отбирали в специальные герметичные пластиковые цилиндры. Химические и микробиологические исследования проводили с пробами, отобранными на участках морского дна около разрушенных контейнеров, погруженных как в песчаные (участок 1), так и в заиленные (участок 2) грунты. Для сравнения численности донной микрофлоры пробы донных отложений отбирали из загрязненных (участки 1, 2) и условно чистых биотопов, удаленных от места загрязнения на 15 – 20 м. Подводные поисковые работы и отбор проб проводили в летний и осенний сезоны 2002 – 2003 гг. Для определения численности и потенциальной активности микроорганизмов, использовали донные отложения, отобранные при температуре 18 – 20<sup>0</sup> С. Изучено 14 проб донных отложений из загрязненных и условно чистых биотопов.

Состояние микробных ценозов различных по загрязнению биотопов оценивали по количественному составу доминирующих групп микроорганизмов. Численность бакте-

рий определяли методом предельных разведений по Мак-Кредди на элективных питательных средах [2]. Использовали следующие питательные среды: мясо-пептонный бульон, МПБ (для сапрофитных бактерий), Виноградского (для нитрифицирующих бактерий), Эшби с маннитом (для азотфиксирующих бактерий), Старки (для тионовых бактерий), Сорочкина (для денитрифицирующих бактерий). Количество гетеротрофных бактерий определяли на плотной белково-агаровой среде, грибов – на среде Сабуро, анаэробных бактерий – на среде Вильсон-Блера. Проведено 4800 микробиологических посевов на различные дифференциальные питательные среды, выделено 46 штаммов микроорганизмов. Штаммы сохранялись на косяках плотной белково-агаровой среды и мясо-пептонного агара с пересевом каждые 3 месяца. Идентификацию актиномицетов и бактерий до рода, видовую идентификацию рода *Thiobacillus* проводили по [5, 6], бактерии рода *Pseudomonas* определяли по схеме поэтапного фенотипичного исследования [7].

Величину pH суспензии донных отложений определяли электрохимически с использованием иономера ЭВ-74. Натуральную влажность грунтов определяли гравиметрически после высушивания проб влажных донных отложений (суспензию донных отложений предварительно обсушивали с помощью фильтровальной бумаги) при 105<sup>0</sup>С. Содержание органического вещества (ОВ) оценивали по потере в массе после прокаливания при 550<sup>0</sup>С проб донных отложений, предварительно высушенных при 105<sup>0</sup>С. Определение общего содержания серы ( $\Sigma S$ ) проводили весовым методом после окисления 1 – 5 мл суспензии донных отложений бромом в щелочной среде, отделения осадка на стеклянном фильтре и осаждения из полученного фильтрата сульфат-ионов 10 % хлористым барием по [9]. Проведено 42 определения  $\Sigma S$  в донных отложениях из загрязненных и условно чистых биотопов.

**Результаты и обсуждение.** В процессе подводных поисковых работ водолазами было отмечено, что из разрушенных контейнеров в донные отложения поступает вязкая пастообразная масса. Вокруг контейнера на участках морского дна в радиусе 1.0 – 1.5 м наблюдались слои белого и светло-серого осадка, глубиной 1 – 2 см. Химический анализ показал, что в донных отложениях таких участков содержание  $\Sigma S$  достигало 10 – 15 %. В условно чистых донных отложениях содержание  $\Sigma S$  не превышало 0,20 %. Химические и токсикологические исследования пастообразной массы, поступающей из разрушенных контейнеров в донные отложения, проведены Институтом физиологии и токсикологии Академии медицинских наук Украины. Результаты анализов показали, что в сложной по составу смеси соединений присутствуют хлорированные органические сульфиды и хлорированные углеводороды. По степени токсичности исследованная смесь химических соединений, образовавшихся в течение шестидесятилетнего контакта  $\beta$ ,  $\beta'$ -дихлордиэтилсульфида с морской водой, отнесена к 2 классу токсичности, что отмечено нами ранее [3]. В местах утечки  $\beta$ ,  $\beta'$ -

дихлордиэтилсульфида в донных отложениях возрастает содержание ОВ. Потери при прокаливании, как косвенный показатель содержания ОВ, в песчаных грунтах достигали 42.0 – 44.2 %, в заиленных грунтах не превышали 36.5 %, что в 2 – 3 раза выше, чем в условно чистых донных отложениях.

Микробиологические исследования токсичных для флоры и фауны донных отложений показали присутствие в них жизнеспособной микрофлоры с разнообразными физиолого-биохимическими свойствами. Для микробных ценозов загрязненных биотопов характерно увеличение численности микроорганизмов, использующих в метаболических процессах ОВ. Доминировали гетеротрофные и сапрофитные бактерии, использующие органические формы азота; морские грибы, актиномицеты и микроорганизмы, разрушающие органическое вещество в процессе денитрификации и тионового хемосинтеза.

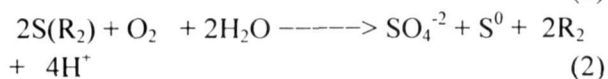
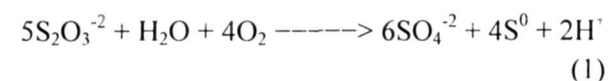
Количественное распределение микроорганизмов в пробах донных отложений из различных по загрязнению биотопов приведено в табл. 1.

Табл. 1 Численность микроорганизмов различных трофических групп в донных отложениях, загрязненных остатками химического оружия на основе  $\beta$ ,  $\beta'$ -дихлордиэтилсульфида

Table 1 The number of different trophic groups of microorganisms in military poisonous matter ( $\beta$ ,  $\beta'$ -dichlorodiethylsulphid) polluted bottom sediments

Наиболее вероятная численность микроорганизмов, кл/г сухого грунта	Исследуемые биотопы			
	Песчаные донные отложения (влажность 26.3 – 39.1%)		Заиленные донные отложения (влажность 43.5 – 72.6%)	
	Загрязненный	Условно чистый	Загрязненный	Условно чистый
Сапрофиты	$(0.6 - 2.2) \cdot 10^8$	$(0.7 - 4.2) \cdot 10^6$	$(6.6 - 9.2) \cdot 10^6$	$(3.1 - 8.7) \cdot 10^5$
Гетеротрофы	$(8.6 - 9.8) \cdot 10^5$	$(1.2 - 4.7) \cdot 10^5$	$(2.6 - 4.3) \cdot 10^3$	$(4.7 - 5.3) \cdot 10^3$
Денитрификаторы	$(0.4 - 2.9) \cdot 10^6$	$(6.2 - 9.7) \cdot 10^3$	$(0.8 - 2.0) \cdot 10^7$	$(0.6 - 9.4) \cdot 10^3$
Нитрификаторы 1 фаза	$(1.8 - 4.2) \cdot 10^3$	$(1.3 - 2.4) \cdot 10^3$	$(0.4 - 6.8) \cdot 10^3$	$(6.1 - 9.4) \cdot 10^3$
Нитрификаторы 2 фаза	$(7.7 - 9.4) \cdot 10^2$	$(2.4 - 6.3) \cdot 10^3$	$(0.8 - 3.3) \cdot 10^2$	$(6.3 - 8.2) \cdot 10^2$
Азотфиксаторы	$(3.5 - 6.2) \cdot 10^6$	$(1.4 - 3.7) \cdot 10^4$	$(7.2 - 9.8) \cdot 10^7$	$(2.4 - 3.8) \cdot 10^4$
Тионовые	$(2.7 - 3.8) \cdot 10^5$	$(1.2 - 2.9) \cdot 10^3$	$(5.4 - 6.9) \cdot 10^6$	$(3.1 - 5.7) \cdot 10^3$
Морские грибы	$(0.6 - 3.5) \cdot 10^6$	$(0.4 - 1.8) \cdot 10^4$	$(2.3 - 4.1) \cdot 10^6$	$(8.7 - 9.2) \cdot 10^4$

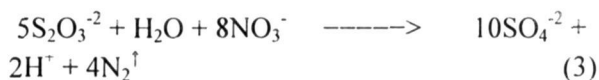
Рост сапрофитной микрофлоры загрязненных грунтов на МПБ сопровождался выделением сероводорода, что отражает их потенциальную способность в процессе жизнедеятельности в природных условиях разрушать связи “углерод – сера”. Бактерии представлены грамположительными и грамотрицательными палочковидными формами, кокковидные формы в исследованных донных отложениях не встречались. Доминирующей группой морских грибов являлись ярко окрашенные представители рода *Aspergillus*. Морские дрожжи и актиномицеты из загрязненных заиленных биотопов представлены родами *Actinomyses* и *Phodoterula*. Увеличение числа тионовых бактерий на среде Старки связано с накоплением в донных отложениях восстановленных органических и неорганических соединений серы. В исследованных загрязненных биотопах содержание  $\sum S$  в 50 – 100 раз выше, чем в условно чистых донных отложениях. Как в песчаных, так и в илистых биотопах доминируют бактерии *Thiobacillus thioparus*, отличающиеся высокой окислительной активностью к восстановленным формам серы. Количество этих бактерий особенно велико в заиленных донных отложениях (см. табл. 1). Нами отмечено, что в слое придонной воды этого биотопа (участок 2) численность *Th. thioparus* достигала  $3.5 - 4.2 \cdot 10^5$  кл/мл. Придонная вода отличалась повышенной мутностью, величина pH во всех исследованных пробах суспензий донных отложений и придонной воды изменялась в пределах 6.0 – 6.5. Биоокисление восстановленных форм серы в системе “донные отложения – придонный слой воды” заиленных биотопов происходит до  $S^0$  и сопровождается подкислением среды, согласно уравнений [8]:



Как отмечено в [4], такой механизм тионового хемосинтеза характерен для зон с

изменчивым окислительно-восстановительным состоянием морской среды. Посевы суспензии донных отложений из заиленных биотопов на плотную среду Вильсон-Блера показали увеличение активности факультативно-анаэробных групп бактерий (повышение плотности колоний в придонном слое и толще среды). Над песчаными донными отложениями (участок 1) повышения мутности придонного слоя воды не наблюдалось.

Совпадение роста численности тионовых (среда Старки) и денитрифицирующих бактерий (среда Сорокина) в суспензиях из загрязненных биотопов позволяет предполагать о возможном росте на этих средах одной и той же группы бактерий, разрушающих ОВ в процессе тиоденитрификации. Для восстановления ОВ до уровня клеточного субстрата бактерии используют энергию окислительно-восстановительной реакции [8]:



Такой путь трансформации ОВ, нитратов и восстановленных форм серы может объяснить высокую численность азотфиксирующих микроорганизмов, для жизнедеятельности которых необходим молекулярный азот (см. табл. 1). Из ассоциаций азотфиксирующих микроорганизмов при пересеве из жидкой среды Эшби выделено 2 штамма бактерий рода *Pseudomonas* (прямые и слегка изогнутые палочки, грамотрицательные, каталазо- и оксидазоположительные). Бактерии, использующие неорганические формы азота (при пересеве со сред Эшби, Виноградского, Сорокина), представлены родами *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrobacter*, *Azotobacter*.

Следует отметить, что в загрязненных донных отложениях в 1.5 – 2.0 раза снижается численность автотрофных нитрифицирующих бактерий, учитываемых на среде Виноградского (1 и 2 фазы нитрификации). Для этой группы бактерий неблагоприятным абиотическим

фактором может быть величина рН, сдвигающаяся в сторону подкисления в результате жизнедеятельности тионовых бактерий.

**Выводы.** Проведенные исследования донных отложений на локальных участках морского дна в местах утечки из затопленных контейнеров остатков химического боезапаса на основе  $\beta$ ,  $\beta'$ -дихлордиэтилсульфида показали что: **1.** Гетеротрофная и хемоорганотрофная донная микрофлора устойчива к действию смеси химических токсикантов, образовавшихся в течение шестидесятилетнего контакта  $\beta$ ,  $\beta'$ -дихлордиэтилсульфида с морской водой. **2.** Доминирующими группами микроорганизмов в загрязненных донных отложениях, наряду с сапрофитной микрофлорой, являются

микроорганизмы, трансформирующие органические вещества в процессе тионового хемосинтеза и тиоденитрификации, а также ассоциации азотфиксирующих бактерий. **3.** В заиленных морских донных отложениях высокую активность проявляют тионовые бактерии, численность которых возрастает в 100 – 1000 раз, по сравнению с условно чистыми донными отложениями; для придонного слоя воды отмечено повышение мутности. **4.** В заиленных и песчаных донных отложениях содержание органического вещества достигает 36.5 и 44.2 % соответственно, содержание  $\Sigma S$  возрастает в 50 – 100 раз, по сравнению с условно чистыми донными осадками.

1. Александров В. Н. Отравляющие вещества. – М.: Наука, 1969. – С. 96. – 127.
2. Аникиев В. В., Лукомская К. А. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – М.: Просвещение, 1977. – 128 с.
3. Антонова Л. С., Гурик В. В., Мисюра А. Г., Билевский Г. О. Екологічні проблеми знешкодження хімічних токсикантів, затоплених в морській економічній зоні України // Екологічні проблеми Чорного моря: Зб. Мат. до 4-го Міжнар. Симп. (31 жовтня – 1 листопада 2002 р., Одеса). – Одеса: ОЦНТЕІ, 2002. – л. 15 – 19.
4. Гулин М. Б. Изучение бактериальных процессов сульфатредукции и хемосинтеза в водной среде Черного моря: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Севастополь, 1991. – 20 с.
5. *Определитель* бактерий Берджи / Под ред. Г. А. Заварзина – М.: Мир, 1997. – 1. – С. 79 – 140.
6. *Определитель* бактерий Берджи / Под ред. Г. А. Заварзина – М.: Мир, 1997. – 2. – 799 с.
7. Смірнов В. В., Опшценко О. М., Кіпріанова О. А. Морські грамнегативні еубактерії, ізольовані з води, моллюсків та водоростей Чорного моря // Мікробіол. журн. – 2001. – 63, 4. – С. 3 – 8.
8. Соколова Г. А., Каравайко Г. И. Физиология и геохимическая деятельность тионовых бактерий. – М.: Наука, 1964. – 332 с.
9. *Унифицированные* методы анализа вод / Под ред. Ю. Ю. Лурье – М.: Химия, 1973. – 374 с.
10. Caraes S. A. NERA compliance for the chemical stockpile disposal program // Environ. Prof. – 1989. – 11, №4. – P. 434 – 446.
11. Games S. A. Disposing of chemical weapons: a desired end in search of an acceptable means // Environ. Prof. – 1989. – 11, №4. – P. 279 – 290.

Поступила 30 сентября 2004 г.

После доработки 18 июля 2005 г.

**Мікрофлора морських донних відкладень в місцях знаходження затоплених токсикантів.** Л. Л. Смирнова, Н. А. Андреева, Л. С. Антонова, А. Г. Мисюра, В. В. Гурик. Приведені результати вивчення життєздатної мікрофлори морських донних відкладень у місцях витікання сполук класу  $\beta$ -хлороорганічних сульфідів із контейнерів, затоплених у період II Світової війни. Відмічена активність сапрофитної мікрофлори, мікроорганізмів що руйнують органічні речовини у процесі тионового хемосинтезу і тиоденітрифікації та азотфіксуючих асоціацій бактерій. У донних відкладеннях і придонному шарі води з'являються хлор- і сірко-вмісні сполуки, підвищується вміст органічної речовини, накопичується елементарна сірка ( $S^0$ ), що значно погіршує екологічну обстановку досліджуваних біотопів.

**Ключові слова:** Чорне море, донні відкладення, полютанти,  $\beta$ -хлороорганічні сульфідів, мікроорганізми

**Microflora of military poisonous matter polluted marine sediments. L. L. Smirnova, N. A. Andreeva, L. S. Antonova, A. G. Misyura, V. V. Gurick.** The results of investigation marine microflora of sediments in which poisonous matter ( $\beta$ -chlorine-organic sulphides) were accumulated near submerged in sea water during 11Word War destroyed metallic boxes are represented. There are heterotrophic microflora, denitrifying, thiooxidizin and nitrogen-fixed bacteria. Sulfur-containing compounds, elemental sulfur was concentrated in marine sediments and near bottom water there. The ecological state of these areas of marine bottom is becoming worse.

**Key words:** Black Sea, bottom sediments, pollution,  $\beta$ , - chlorine-organic sulphides, and microorganisms