

# ФЛУКТУАЦИИ КОНЦЕНТРАЦИИ МОРСКИХ ГЕТЕРОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В УЗКОЙ ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЕ АКВАТОРИИ ФЕОДОСИЙСКОГО РЕГИОНА

Ю.Д. Смирнова

Карадагский природный заповедник г. Феодосия, п. Курортное, ул. Науки, 24  
E-mail: karadag@ukrpost.ua

ОМЧ ГТМ 37 – общее микробное число гетеротрофных микроорганизмов живущих при 37°C исследовали в морской воде Феодосийского региона. Только 2 из 12 антибиотиков уничтожали все типы выделенных ГТМ 37. Рост ОМЧ ГТМ 37 в 2007-2010 гг. происходил на фоне резкого исчезновения мидий в воде прибрежной зоны Карадага. Восстановление скаловых мидий в 2011–2013 гг. сопровождалось снижением числа бактерий в прибрежных акваториях.

**Введение.** Одним из значимых признаков антропогенной эвтрофикации Черного моря является значительно возросшее количество бактерий в воде, особенно в прибрежных зонах, являющихся местами отдыха и оздоровления. Сравнения данных разных авторов показывают тенденцию к увеличению обилия морских бактерий ежегодно. Так результаты исследований с 1979 по 1991 гг. показали, что общая численность бактерий в Черном море составляла от  $0,5 \times 10^6$  до  $7,16 \times 10^6$  кл./мл, а среднее значение  $1,34 \times 10^6$  кл./мл [1]. Численность гетеротрофных бактерий варьировала от 103 до 106 кл./мл, и в среднем составляла 103 – 104 кл./мл. Шумакова Г.В. в 1987, 1989 гг. получила изменения ОЧБ (общее число бактерий) от 0,5 до 1,9 млн./мл в пробах морской воды, взятых в районе Карадага [2]. Если более 20 лет назад лишь в бухтах и прибрежных районах, подверженных эвтрофированию, общее количество бактерий в отдельные сезоны могло возрастать до 2 млн./мл, то в 2005 г. 1–2 млн./мл – обычная численность бактериопланктона даже для открытых районов Черного моря [3].

Наличие условно-патогенных и патогенных бактерий в пляжных зонах является важным санитарно-эпидемиологическим показателем и контролируется соответствующими службами. Научные работы, посвященные морской микробиологии, рассматривают обычно вопросы общего количества бактерий или доли в них нитрофицирующих, нефтеокисляющих, термофильных микроорганизмов, коли-индекса [3 – 5].

Практически не изученным остается вопрос о сезонных изменениях в прибрежной зоне моря количества гетеротрофных бактерий, способных развиваться при 37°C. Эта часть морской микробиоты, не являясь патогенной, при определенных условиях может проявить себя как условно патогенная, способная вызвать инфекционные осложнения.

Таким образом, любые исследования подобного направления, несомненно, актуальны и важны для санитарной медицины, для экологии моря.

Предварительные исследования, проведенные нами в 2006 – 2007 гг., выявили значительное повышение концентрации гетеротрофных бактерий, растущих при 37°C, в морской воде узкой прибрежной зоны Карадагского заповедника. Особенно высокие цифры, больше ПДК (100 кл./мл), отмечались в летнее время на границах заповедника и в акваториях п.п. Курортное и Коктебель, т.е. в пляжных зонах [6].

Задачей данного исследования было изучение изменения содержания гетеротрофных бактерий, растущих при 37°C (ГТМ 37), в воде узкой прибрежной зоны акватории Карадага и пляжных зон большой Феодосии.

**Материалы и методы.** Пробы воды регулярно отбирались с лодки специальным черпаком на расстоянии 50 – 100 м от берега с глубины 0,5 – 0,7 м от поверхности в стерильную посуду, на 8 постоянных станциях: 7 в акватории заповедника и 8 ст. в бухте очистных сооружений п. Курортное (рис.1). В 2008 г. в весенне-летний период также отбирали пробы воды с берега в нескольких

точках Феодосийского и Коктебельского заливов. В Феодосийском заливе отбирали три пробы воды на Золотом пляже (восточная часть залива), три пробы на городских пляжах (центральная часть

залива) и одну пробу в западной части залива. В Коктебельском заливе пробы воды отбирали в восточной части пляжей у холма Юнге и в западной части – у гостиницы «Белый грифон» ОМЧ

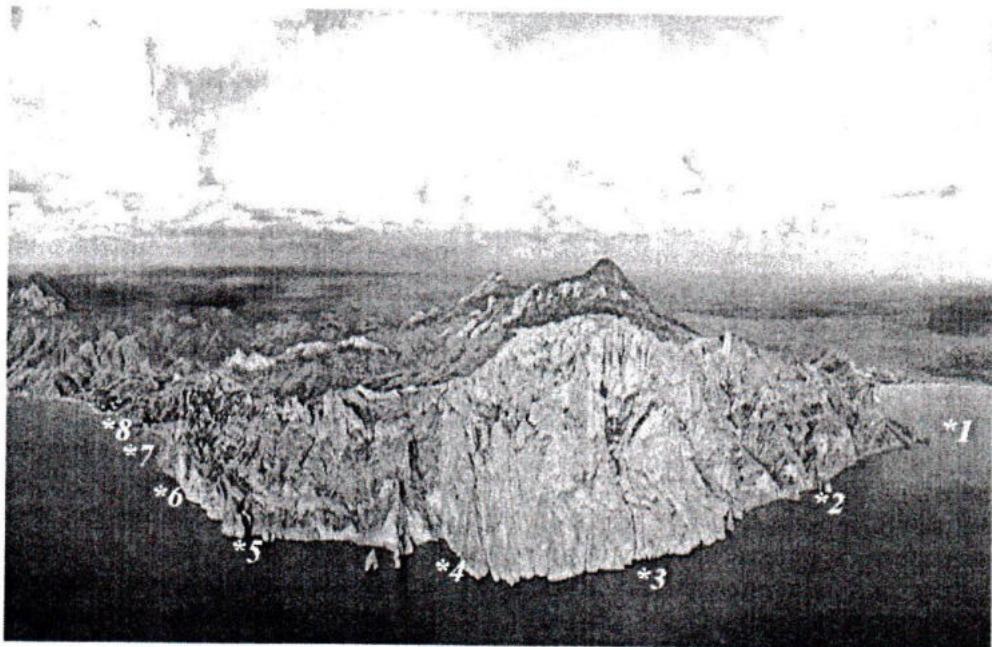


Рис. 1. Схема расположения станций отбора проб в прибрежной зоне Карадага (1 – мыс Мальчин, 2 – Сердоликовая бухта, 3 – Скала Шайтан, 4 – Львиная бухта, 5 – скала Иван-разбойник, 6 – камни Кузьмича, 7 – бухта Биостанция, 8 – бухта Очистных сооружений)

ГТМ 37 определяли как количество колониеобразующих форм гетеротрофных микроорганизмов, растущих при 37<sup>0</sup>С, по общепринятой методике в нашей модификации: культивированием 1 мл воды с 10 мл 4 % агаровой среды для определения КМАФАнМ (количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов) при 37<sup>0</sup>С в течение 48 часов. Использовали при необходимости метод последовательных разведений. Среду для культивирования клеток готовили на кипяченной морской воде, разведенной в соотношении 1:1 дистиллированной водой. Подсчет колоний (колонии образующих единиц) проводили общепринятыми методами и выражали КОЕ/мл [7]. Для определения устойчивости бактерий к антибиотикам использовали также агаровую среду Мюллера-Хинтона (Mueller Hinton Agar), предназначенную для этих целей.

Пересевы бактерий проводили в бактериологической лаборатории под руководством зав. лабораторией врача I кате-

гории Феодосийской портовой СЭС Крымского бассейна Устиновой Л.В.

**Результаты и обсуждение.** Акватории п. Коктебель на востоке и п. Курортное на западе примыкают к границам заповедника. Уже в 2007 г. особенно высокие значения ОМЧ, превышающие ПДК (100 кл./мл) в 1,5 – 2 раза, мы отмечали в летнее время на границах заповедника и в воде пляжей п.п. Курортное и Коктебель. Причем, за сезон 2007 г. именно в акваториях поселков были обнаружены летом новые, ранее не фиксируемые в этом районе, гетеротрофные бактерии, образующие цветные колонии и многочисленные микроколонии.

В 2008 г. среднегодовые значения ОМЧ были больше, чем в 2007 г. и по всей акватории превышали ПДК, а у границ заповедника в 2-3 раза. Увеличение концентрации бактерий в 2008 г. произошло в значительной мере за счет роста числа микроколоний, которые составляли 30 – 50 % от общего количества. В прибрежной зоне Феодосии и Кок-

тебеля в апреле – июне 2008 г. величины ОМЧ не значительно превышали ПДК на станциях даже в черте города. Однако в июле – августе количество ГТМ 37 в Феодосии было больше ПДК в 3 – 8 раз, особенно на городских пляжах. Акватории в районе Золотого пляжа в восточной части залива были более чистыми, вероятно из-за фильтрации воды двустворчатыми моллюсками в прибрежной зоне, уцелевшими от рапан *Rapana venosa* Valenciennes, 1846. Малые глубины на протяжении 50 – 80 м от берега ограничивают присутствие рапан (во время волнения их перекатывает, забивая песком). В Коктебельском заливе значения ОМЧ ГТМ 37 в этот период превышали ПДК в 2–5 раз. В посевах этих проб наблюдались также цветные колонии и значительное количество микроколоний.

Цветные (оранжевые, красные) колонии появляются в теплый период и, вероятно, состоят из термофильных микробов, бактерии микроколоний сохраняются и в холодное время года. Всего мы выделили 6 основных разновидностей колоний, вырастающих на 4 % среде КМАФАнМ при 37°C: белые выпуклые, морщинистые, красные и оранжевые на поверхности агара и в толще агара: прозрачные и микроколонии. В табл. 1 приведены характеристики клеток, выделенных из разных типов колоний. Видно, что I и III типы колоний образуют гетерогенные по составу микроорганизмы грам+ и грам -.

Все бактерии активно растут при 37°C, уже через сутки дают обильный рост. При многократных пересевах сохраняют цвет и форму колоний.

При хранении в холодильнике в течение 2-3 недель при +4°C микробы, образующие на агаре разные формы бесцветных колоний сохраняют свою жизнеспособность на 70 – 80 %. Бактерии, при культивировании на агаре образующие красные и оранжевые колонии, при этих же условиях хранения сохраняют 30 % жизнеспособности.

В посевах проб воды весной и осенью присутствовали обычно только бесцветные колонии, в большей степени небольшого диаметра. Таким образом, микроорганизмы, дающие цветные ко-

лонии, можно отнести к разряду термофильных. После холодной зимы 2005 г. мы в посевах воды из акватории заповедника в 2005 – 2006 гг. практически не встречали цветные колонии.

Выделенные 6 линий типов клеток были протестированы на устойчивость – чувствительность к антибиотикам. Каждой культурой параллельно засевались чашки Петри со средой КМАФАнМ и средой Мюллера-Хинтона. На засеянные чашки выкладывались тест-диски, пропитанные антибиотиками. Всего провели 12 препаратов: клиндамицин, цефтазидим, амоксицилин, цефтриаксон, цефазолин, цефотаксим, амикацин, цефалексин, гентамицин, тетрациклин, ванкомицин, ципрофлоксацин.

Результаты анализа представлены в табл. 2. Видно, что пять антибиотиков: клиндамицин, цефазолин, цефалексин, тетрациклин, ванкомицин не эффективны против роста этих микробов. Диаметры их прозрачных дисков лизиса бактерий значительно меньше установленных контрольных значений.

Еще четыре антибиотика: цефтазидим, амоксицилин, цефтриаксон и цефотаксим показали выборочную бактерицидность. Так, цефтазидим и цефриаксон оказались эффективны против грам+ палочек, образующих красные колонии. Амоксицилин дал положительную реакцию на грам+ споровые палочки, образующие оранжевые колонии. Цефотаксим активно подавляет рост бактерий, образующих и оранжевые, и красные колонии.

И только три препарата оказались универсальными: гентамицин, ципрофлоксацин показали высокую эффективность лизиса всех типов выявленных бактерий, а амикацин активно подавлял рост 5-ти из 6 типов изученных микроорганизмов, кроме споровых грам+ палочек, образующих прозрачные колонии. В 2009 г. мы зафиксировали еще более интенсивный рост концентрации микроорганизмов (КГМ 37) в сравнение с 2008 г. в воде узкой прибрежной зоны Карадага (рис. 2).

На рис. 2 представлены результаты посева проб, которые мы брали совместно с экспедицией ИнБЮМ на их станциях

отбора воды батометром у поверхности и у дна над глубинами 9–15 м. Интересно, что с увеличением концентрации ГТМ 37 в поверхностном слое прибрежных акваторий в 2009 г. в придонной зоне также шло накопление значительных количеств живых гетеротрофных бактерий. Следовательно, можно говорить о шир-

роком благоприятном температурном спектре для этих микроорганизмов т.к. температура у дна особенно весной и осенью может быть 6–8 °С и ниже. На рис. 3 можно увидеть ежегодные изменения среднегодовых значений ОМЧ на каждой из 8 станций. Видно, что с каждым годом наблюдается увеличение

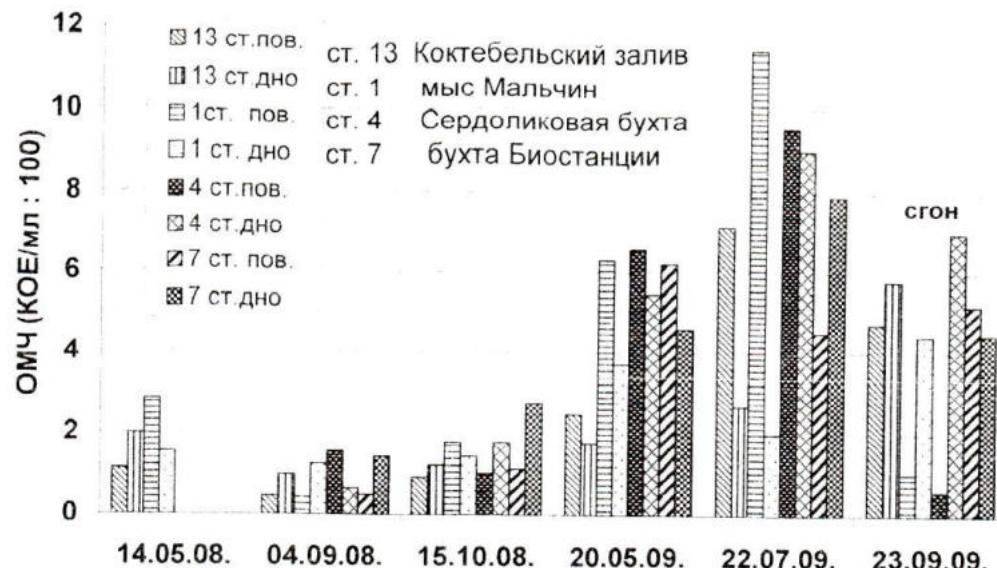


Рис. 2. Сезонные изменения содержания ГТМ 37 в акваториях у побережья Карадага

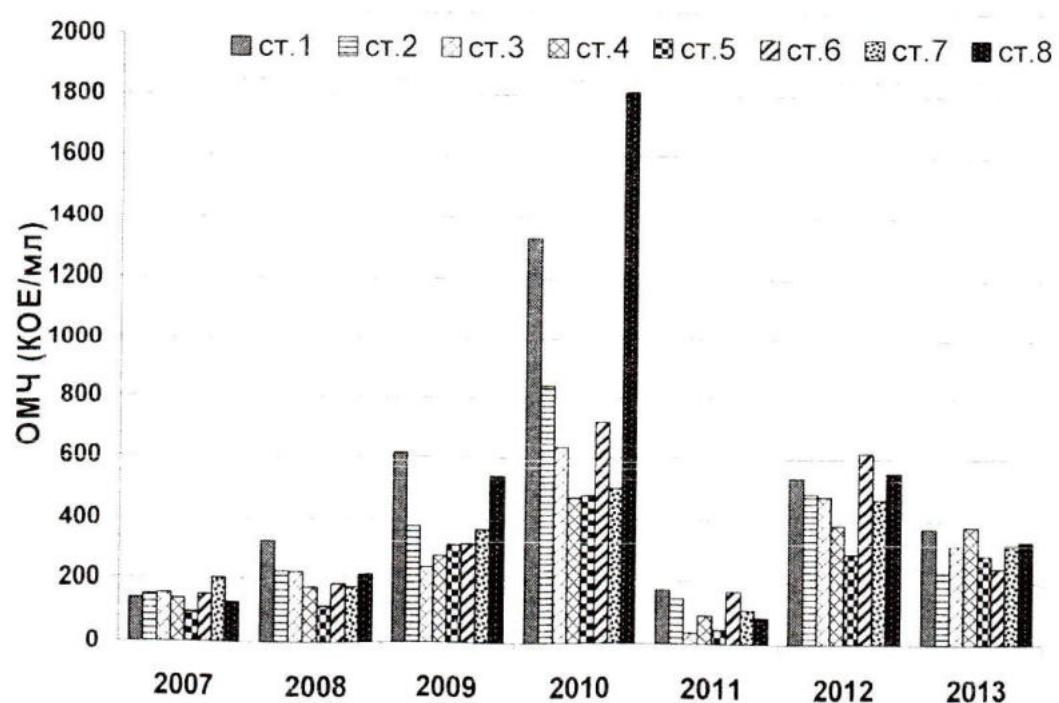


Рис. 3. Кинетика ОМЧ ГТМ 37 в узкой прибрежной зоне КаПриЗ в 2007–2013 гг.

Таблица 1

Характеристики клеток ГТМ 37, образующих разные типы колоний

Тип колоний	Тип клеток	Окраска по Граму
1. Белые выпуклые	Палочки прямые и изогнутые.	грам + грам -
2. Анаэробные прозрачные	Споровые палочки	грам + споровые
3. Морщинистые	Полиморфные палочки	грам + грам -
4. Микроколонии	Кокки	грам +
5. Оранжевые колонии	Споровые палочки	грам + споровые
6. Красные колонии	Толстые и тонкие палочки	грам +

Таблица 2

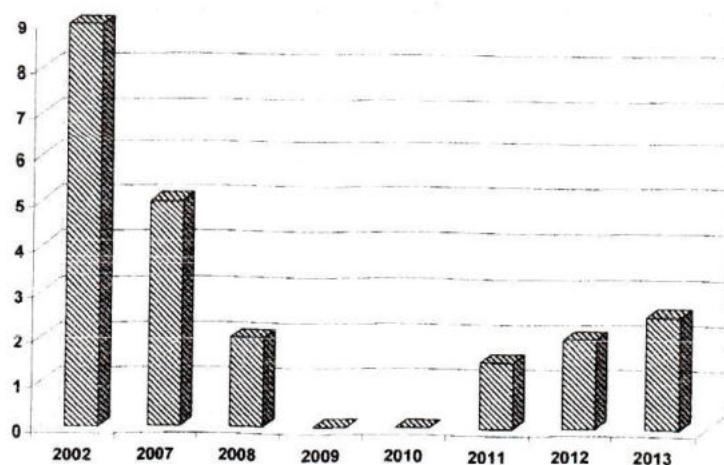
Проверка чувствительности бактерий к антибиотикам. Сравнивались параллельно диаметры (мм) дисков лизиса бактерий, выращенных на среде КМАФАНМ (мм/мм)

Kohrt. D (mm)	Tin ketrot Chindamycin	Ceftrazidim Amoxyillin	Zeftralolin Leffazolin	Zefotaksimycin Leffazolin	Aminkauun Zefalexin	Gentamizin Teraziklin	Barkomizin Tetrabuturkini	Ziprofokszam- lin
> 21	> 18	> 16	> 21	> 19	> 21	> 17	> 19	> 16
1	-/-	15/16	-/-	-/-	21/20	-/-	19/19	-/-
2	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	16/16	-/-	-/-
3	-/-	-/18	-/-	-/-	17/17	-/-	16/16	19/19
4	-/-	16/16	16/17	-/-	22/22	-/-	21/22	-/-
5	-/-	-/-	17/17	-/-	21/20	20/20	-/-	13/14
6	-/-	18/18	14/14	21/21	-/-	22/23	19/20	-/-
								22/22

концентрации антропогенных бактерий, рас-  
тущих при 37°C. В 2009 г. среднегодовые зна-  
чения составили 2-3 ПДК в центре заповедни-  
ка и 5-6 ПДК в приграничных акваториях,  
причем число микроколоний зачастую состав-  
ляло 30 – 70 % ОМЧ.

При этом следует заметить, что в мае 2008 г. и в начале июля 2009 г. отмечался пе-  
риод резкого снижения количества КГМ 37 по  
всей акватории заповедника до величин мень-  
ших или сравнимых с ПДК. на каждой из 8  
станций. В этот период микроколонии почти  
отсутствовали. Наблюдаемые явления могут  
быть связаны с перемешиванием воды штор-  
мами или апвеллингом, либо с сезонным на-  
личием иных причин, способных снизить кон-  
центрацию ГТМ. 2010 г. был отмечен ано-  
мально высокими температурами воздуха и  
морской воды в летний период. Температура моря в узкой прибрежной зоне Карадага была выше 20 градусов с начала июня и до конца сентября и выше 25 градусов в июле-августе. В начале июня 2010 года мы вновь получили низкие концентрации КГМ 37, а в июле-сентябре эти значения были очень велики. Так в конце августа ОМЧ КГМ 37 составляло 6 – 12 ПДК в центре заповедника и 16 – 30 ПДК в приграничных акваториях. В сентябре разброс значений ОМЧ составляет от 670 до 2100 КОЕ/мл. Интересно, что в октябре – декабре 2010 г. были отмечены очень низкие концен-  
трации бактерий, в основном десятки и даже единицы КОЕ/мл. При этом нами зафиксиро-  
вана необычайно высокая прозрачность воды.

Можно предположить, что прогрев мор-  
ской воды в августе до 26 – 28°C, вызвал  
массовую гибель некоторых видов бакте-  
рий или появились иные факторы, способ-  
ные резко снизить их количество. Напри-  
мер, массовое развитие желетелых или зоо-  
планктона, которые активно поглощали микробиоту. Следует отметить, что за на-  
званный период (2007 – 2010 гг.), происходило интенсивное снижение количества на-  
скальных митилид, особенно мидий *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. Мидия – ос-  
новной биофильтр Черного моря, способна отфильтровывать из воды более 90 % бак-  
терий. На рис. 4 видна кинетика максималь-  
ных глубин обитания половозрелых мидий с 2007 по 2013 гг. В 2006 г. плотные поселе-  
ния половозрелых мидий отмечались нами на скалах до 6 м глубины от поверхности, а в 2007 г. – на 4 – 5 м. В 2008 г. мидии оста-  
лись лишь до 2-х метров от поверхности. К весне 2010 г. на скалах заповедника наблю-  
дались лишь редкие друзы мидий у поверх-  
ности воды. Во многих местах, например на скале Золотые ворота в центре заповедной акватории, отсутствовали и мидии, и мити-  
листеры даже на урезе воды. Основной причиной исчезновения митилид мы счита-  
ем хищного моллюска-вселенца *Rapana venosa* Valenciennes, 1846. В 2004 – 2008 гг. отмечалось прогрессирующее увеличение количества рапан на скалах Карадага. Плот-  
ность их на поселениях мидий достигала 10 – 12 шт./м<sup>2</sup> и, используя данные В.Д. Чухчина



Р и с. 4. Изменение максимальных глубин поселений половозрелых мидий на скалах Карадага.  
По оси абсцисс – годы наблюдения, по оси ординат – глубина от поверхности (м)

[8] мы считали, что при минимальной плотности рапан: 0,1 шт./м<sup>2</sup> за летний сезон на 1 км<sup>2</sup> акватории заповедника им для питания необходимо не менее 20 тонн биомассы гидробионтов. В 2008 – 2009 гг. мы фиксировали все больший процент тощих рапан и снижение их размерно-массовых характеристик из-за отсутствия полноценного питания. Рапаны питались митилястерами, т.к. мидии они уничтожили. В 2010 г. рапаны почти не наблюдались и в конце осени на прибрежных скалах на урезе воды появилась молодь митиляид. В 2011 г. молодь двустворчатых моллюсков заселила скалы слоем шириной 0,5 – 1 м у поверхности воды. И в 2011 г. мы получали низкие концентрации бактерий в воде прибрежной зоны заповедника (рис. 3). Рапаны в 2011 г. также не наблюдались, но в 2012 – 2013 гг. их число и размерные характеристики увеличились. Поэтому хотя глубина поселений мидий увеличилась, но к осени оставались лишь разрозненные друзы мидий и разреженные поля митилястра. Соответственно значения ОМЧ ГТМ 37 в сравнении с 2011 г. возросли.

Эти значения были ниже в весенне-зимний период начала года, когда выросшие мидии активно фильтруют воду. К осени со снижением числа мидий концентрации гетеротрофных бактерий увеличиваются. К сожалению, из-за бактериально-органической пленки, покрывающей скалы популяции митиляид ниже 3 – 4 м от поверхности не восстанавливаются.

**Заключение.** Показана высокая степень контаминации, превышающая ПДК, акваторий большой Феодосии, особенно городских пляжей в летнее время бактериями, растущими при 37°C. Важным результатом исследований является определение устойчивости выделенных микроорганизмов к ряду антибиотиков и выявление 3 препаратов с высоким бактерицидным потенциалом. Установлены сезонные различия в качественном составе бактерий в прибрежной зоне моря, наличие термофильных бактерий, появляющихся только в теплый период.

В акваториях с повышенной антропогенной нагрузкой их экологическая безопасность зависит от наличия полноценных поселений мидий. Модули искусственных рифов с ло-

вушками против рапан – один из методов восстановления мидий и экологической безопасности пляжно-оздоровительных акваторий.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беляева О.И. Результаты исследования бактерионестона Черного моря // Экология окружающей среды стран СНГ. – М., 2003.
- Шумакова Г.В. Распределение бактериопланктона у юго-восточного побережья Крыма в весенний и летний периоды // Карадаг. Сб. научных трудов, посвященный 85-летию Карадагской научной станции. – Симферополь: «СОНАТ». – 2001. – С. 112 – 118.
- Мошарова И.В., Сажин А.Ф. Бактериопланктон Северо-восточной части Черного моря в летний и осенний период // Океанология. – 2007. – № 5. – С. 720 – 728.
- Рубцова С.И., Егоров В.И. Влияние абиотических факторов на численность нефтеокисляющих бактерий в прибрежных районах Черного моря // Экология моря. – 2004. – № 66. – С. 91 – 99.
- Бутаев А.М., Кабыш Н.Ф. О роли нефтеокисляющих микроорганизмов в процессах самоочищения прибрежных вод Дагестанского побережья Каспийского моря от нефтяного загрязнения // Вестн. Даг.НЦ РАН. – 2002. – № 11. – С. 56 – 69.
- Смирнова Ю.Д., Алексеева В.Е., Кондратьева Е.И. Исследование узкой прибрежной зоны акватории КаПриЗ в 2007 г. // Летопись природы Карадага 2007 г. – Симферополь: «Н. Орианда». – 2009. – № XXIV. – С. 228 – 233.
- Методические указания по гигиеническому контролю загрязнения морской среды МЗ СССР № 2260-80 // Сборник важнейших официальных санитарно-гигиенических и правовых вопросов МОЗ Украины. – Киев. – 1995. – С. 220 – 249.
- Чухчин В.Д. Функциональная морфология рапаны. – Киев: Наук. думка. – 1970. – 134 с.