

Репина (Смирнова)

Мария Андреевна

**Нефтеуглеводородоокисляющие микроорганизмы
прибрежных вод юга острова Сахалин**

Специальность 03.00.16 – экология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток

2009

Работа выполнена в химико-аналитической лаборатории и лаборатории болезней рыб Сахалинского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии, а также на кафедре общей экологии Дальневосточного государственного университета МОН РФ.

Научный руководитель: БУЗОЛЕВА Любовь Степановна,
доктор биологических наук, профессор.

Официальные оппоненты: ЛУКЬЯНОВА Ольга Николаевна,
доктор биологических наук;

ГОЛОДЯЕВ Григорий Петрович,
кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация: Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск

Защита диссертации состоится 23 мая 2009 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 212.056.02 при Дальневосточном Государственном Университете МОН РФ по адресу: 690950, г. Владивосток, ул. Октябрьская, 27, ауд. 435

Отзывы на автореферат просим отправлять по адресу: 690950, г. Владивосток, ул. Октябрьская, 27, комн. 417, кафедра общей экологии. Факс: (4232) 45-94-09.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Дальневосточного государственного университета МОН РФ.

Автореферат разослан «21» апреля 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент

Ю. А. Галышева



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В общей цепи взаимодействия человека с гидросферой важное звено принадлежит управлению прибрежной зоной моря, где осуществляется высокая хозяйственная активность и сталкиваются потоки загрязняющих веществ, поступающих как со стороны суши, так и со стороны моря. В последнее время прибрежные акватории наиболее сильно страдают от нефтяного загрязнения в большинстве своем антропогенного происхождения. Поскольку нефтяные углеводороды (НУ) являются неотъемлемым природным компонентом морской среды, в процессе эволюции выработался довольно эффективный механизм их деструкции с участием микроорганизмов.

Экологическое значение бактерий, как разрушителей углеводородов нефти в море, очень велико, так как известно, что более высокоорганизованные формы организмов не могут осуществлять их полную деструкцию (Bruns et al., 1993). В прибрежной зоне, постоянно загрязняющейся нефтью и нефтепродуктами, формируются специфические сообщества гетеротрофных микроорганизмов, которые обладают широким спектром окисления углеводородов и продуктов их трансформации (Миронов, 2002). Видовой состав и численное соотношение видов в таких микробных консорциумах постоянно меняется. Однако ядро последних неизменно составляют НУокисляющие (НУО) и НУустойчивые бактерии.

Деструктивная активность НУО микроорганизмов зависит от многих факторов: температуры, солености, солнечной радиации, наличия питательных субстратов и др. (Квасников, Ключникова, 1981; Одум, 1986). В связи с этим необходимо уделять особое внимание изучению динамики численности, видового разнообразия и биологических свойств НУО штаммов в каждом конкретном регионе. Особенно это касается северных акваторий, где в условиях низких температур легкие фракции нефти, образующие пленку на поверхности воды, испаряются и разлагаются микроорганизмами гораздо медленнее. А тяжелые компоненты, которые оседают на дно, становятся источником вторичного загрязнения (Трунова, 1979; Коронелли и др., 1989).

Уникальным полигоном для изучения деятельности НУО бактерий в северных морях являются прибрежные акватории о. Сахалин, поскольку здесь имеются все возможные источники нефтяного загрязнения, как антропогенного, так и природного происхождения (Комплексные исследования..., 1997). В литературе мало данных, касающихся исследований микробных сообществ, характеризующих органическое загрязнение прибрежных вод о. Сахалин. Все проведенные к настоящему моменту исследования носят эпизодический характер и поэтому мало информативны (Журавель и др., 2004; Микробная индикация качества..., 2004, 2005).

Цель исследования — изучить сообщества НУО морских микроорганизмов и биологические особенности их отдельных штаммов из прибрежной зоны юга о. Сахалин.

Задачи исследования:

1. Выявить доминирующие микроорганизмы прибрежных вод юга о. Сахалин в условиях органического загрязнения на основе анализа численности микробных экологических групп.
2. Дать характеристику НУО способности бактерий, выделенных из разных мест прибрежной зоны юга о. Сахалин.
3. Провести сравнительный анализ биологических свойств микроорганизмов, выделенных из прибрежных акваторий с разным характером загрязнения (южная часть Приморского края и о. Сахалин), как перспективных для биоремедиации.

Научная новизна. Впервые показано, что в микробных сообществах прибрежных вод юга о. Сахалин доминирующими по численности являются НУО микроорганизмы, обладающие психрофильными свойствами.

Установлено, что сообщество НУО микроорганизмов гетерогенно по характеру роста на НУ и способности к нефтеокислению. Указанные микроорганизмы можно разделить на три физиологические группы: НУО «микроорганизмы – эмульгаторы», НУО «микроорганизмы прямого контакта», НУО устойчивые.

НУО микроорганизмы прибрежных вод юга о. Сахалин отличаются по видовому составу от таковых, описанных в литературе, и выделенных из других акваторий. Впервые доказана способность к нефтеокислению у микроорганизмов родов: *Thalassospira*, *Halomonas*, *Oceanisphaera*, *Pseudoalteromonas*.

Установлено, что НУО микроорганизмы, выделенные из районов с разной степенью и характером загрязнения, отличаются способностью выдерживать высокие концентрации тяжелых металлов, нефтеуглеводородов, гидролизовать легкоразлагающиеся органические вещества. Поэтому для эффективной биоремедиации, целесообразно использовать аборигенные НУО штаммы, способные адаптироваться к воздействию загрязнителей в месте их обитания.

Практическая значимость. В прибрежной зоне юга о. Сахалин собрана коллекция НУО микроорганизмов (67 штаммов), штаммы которой обладают высокой способностью к утилизации основных нефтеуглеводородов (алканы, циклоалканы, ароматические соединения) и могут быть использованы для биоремедиации морской среды.

Предложен новый способ скринингового определения НУО активности бактерий морских микробных сообществ по характеру роста бактериальной культуры на плотных питательных средах, содержащих НУ.

Коллекция культур и материалы диссертации используются в лекционном курсе по экологии микроорганизмов, а также в Большом микробиологическом практикуме для студентов-экологов.

Положения, выносимые на защиту:

1. В прибрежных водах юга острова Сахалин, особенно в районах с высокой антропогенной нагрузкой, в структуре микробных сообществ по численности доминируют НУО микроорганизмы.

2. Сообщества НУО микроорганизмов прибрежных вод юга о. Сахалин являются гетерогенными по способности к окислению нефтеуглеводородов, отличаются по видовому составу и биологическим свойствам от микроорганизмов, выделенных из других акваторий.

Апробация результатов диссертации. Результаты и основные положения работы были представлены на XII ежегодном совещании северотихоокеанской морской научной организации (Сеул, 2003); VII региональной конференции по актуальным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии (Владивосток, 2004), III интернациональном симпозиуме по Арктическим исследованиям (Токио, 2005); IX Международной научной конференции «Здоровье семьи – 21 век» (Далянь, 2005), I (XIX) Международной конференции молодых ученых «Изучение природных катастроф на Сахалине и Курильских островах» (Южно-Сахалинск, 2006), II (XX) Международной конференции молодых ученых «Природные катастрофы: изучение, мониторинг, прогноз» (Южно-Сахалинск, 2007), II байкальском микробиологическом симпозиуме с международным участием «Микроорганизмы в экосистемах озер, рек, водохранилищ» (Иркутск, 2007), II Международной микробиологической школе «Микробиологические методы в экологических исследованиях» (Владивосток, 2007), XIII Международной научной конференции «Здоровье семьи – XXI век» (Хургада, Египет, 2009), а также на коллоквиумах СахНИРО и семинарах кафедры общей экологии ДВГУ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 работ.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав результатов исследований и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы (269 источников, в том числе 85 иностранных) и пяти приложений. Диссертация изложена на 149 страницах, включает 32 рисунка и 10 таблиц.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю доктору биологических наук, профессору Л. С. Бузолевой за ценные замечания и постоянное внимание, а также сотрудникам экспериментальных лабораторий СахНИРО, НИИЭиМ СО РАН и ДВГУ, оказавших практическую помощь при выполнении исследований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА I. Нефтеокисляющие микроорганизмы в морской среде (обзор литературы)

В главе рассматриваются современные источники загрязнения морских вод, в том числе прибрежных вод о. Сахалин, нефтью и нефтепродуктами. Показаны состав и физические свойства нефти и нефтепродуктов, попадающих в морскую воду, этапы деградации и окисления нефти в морской воде, биологическое окисление с помощью НУО микроорганизмов, действие факторов среды, влияющих на окисление.

ГЛАВА II. Районы работ. Материалы и методы исследований

Материалом исследования послужили ежесезонные (зима, весна, лето, осень) экспедиционные данные 2004–2006 гг., полученные на семи станциях в прибрежных водах южной части о. Сахалин. В заливе Анива выполнены четыре станции (пос. Пригородное, порт Корсаков, б. Лососей, пос. Золоторыбное), в Татарском проливе – две (б. Полякова, порт Холмск), в заливе Мордвинова – одна станция (пос. Охотское) (рис.1).

Пробы морской воды для гидрохимических и микробиологических исследований отбирали из поверхностного горизонта согласно ГОСТ 51592-2000.

Гидрохимические анализы проводили согласно стандартным методикам. В пробах морской воды определяли следующие параметры: температуру, соленость (портативный зонд YSI 63), водородный показатель (pH) (РД 52.10.243-92); растворенный кислород (РД 52.10.243-92); биохимическое потребление кислорода за 5 суток (БПК₅) (РД 51.24.420-95); концентрацию биогенных элементов определяли в химико-аналитической лаборатории СахНИРО (РД 52.10.243-92).

Микробиологические методы исследований. Учет общей численности гетеротрофной микрофлоры проводили методом предельных разведений (Егоров, 1983) на жидкой питательной среде для морских микроорганизмов (СММ) (Yochimizu, Kimura, 1976). Численность бактерий группы кишечной палочки определяли на среде Эндо методом Коха (Егоров, 1983).

Получение изолированных колоний НУО штаммов осуществляли методом посева 0,1 мл из среды накопления на поверхность плотной среды МКД (метод Дригальского) (Руководство по методам..., 1980) с добавлением сырой сахалинской нефти (месторождение «Чайво») или флотского мазута в 1% концентрации.

Для определения устойчивости к НУ осуществляли пассирование штаммов на средах с нефтью или флотским мазутом, которые вносили в расплавленный агар в концентрации 2%, 4%, 6%. На агаровых пластинах делали отпечатки стерильным аппликатором с культурой. Чашки культивировали 5–7 суток при комнатной температуре.

Определение аμιлолитической, протеолитической и липолитической активности проводили стандартными методами (Методы общей..., 1983).

Устойчивости НУО микроорганизмов к тяжелым металлам оценивали на основе определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) соли изучаемого металла (Lambert, Pearson, 2000).

Деструкцию НУ микроорганизмами регистрировали методом визуальной оценки (ZoBell, 1973).

Для исследования способности микроорганизмов к биодegradации нефтяных углеводов, брали сырую нефть месторождения «Чайво», подвергали ее перегонке при атмосферном давлении, и в качестве модельной смеси УВ использовали фракцию, выкипающую в интервале температур $T_{\text{вык.}} = 30-200^{\circ}\text{C}$. В стерильные колбы, содержащие 160 мл синтетической минеральной среды МКД, вносили 40 мл фракции нефти $T_{\text{вык.}} = 30-200^{\circ}\text{C}$ и суспензию штамма 1 млрд. клеток в 200 мл жидкой среды. Культивирование микроорганизмов производили при комнатной температуре. Отбор проб производили на 1 и 8 сутки эксперимента.

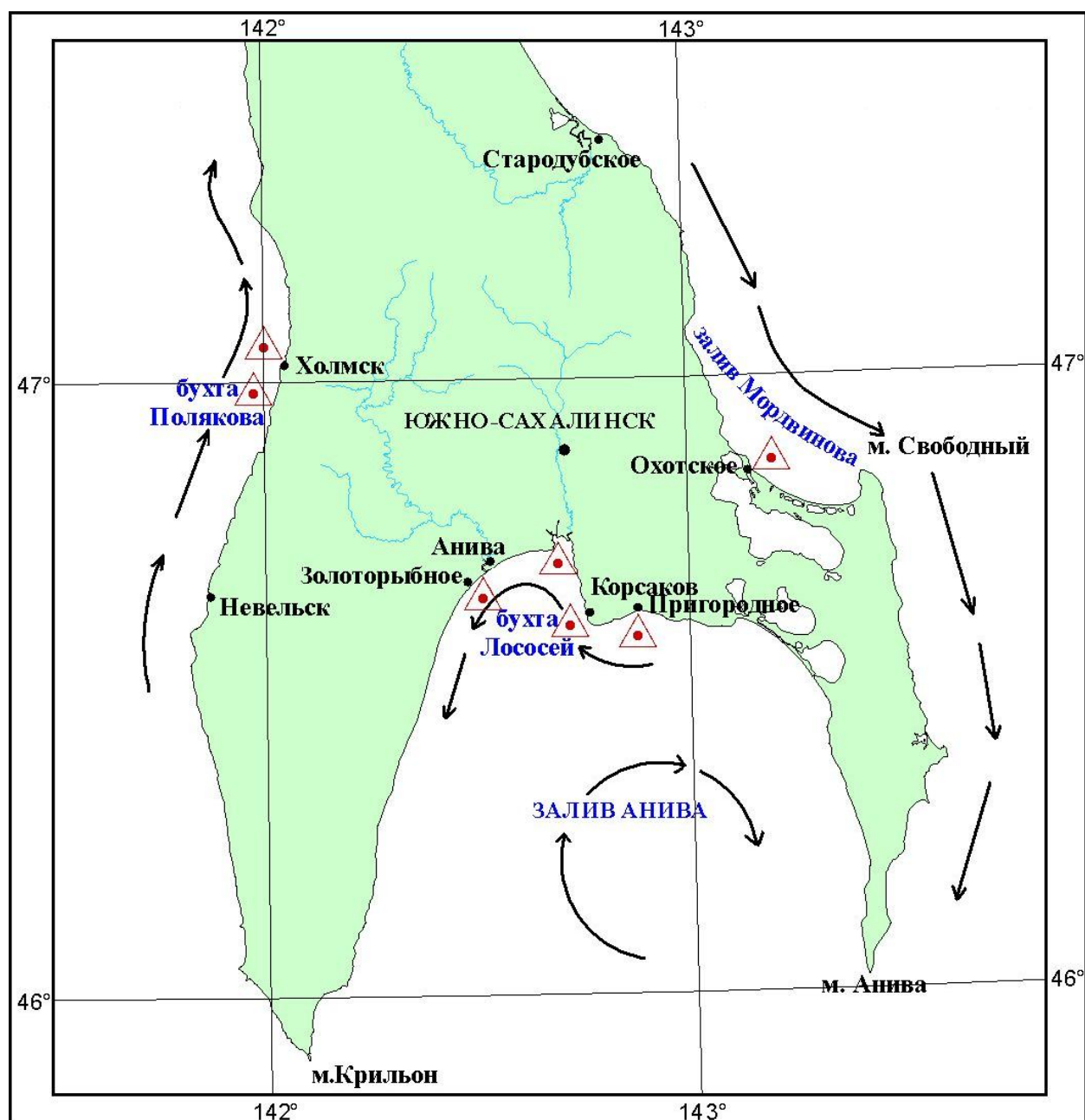


Рис. 1. Карта районов исследований (треугольники – места отбора проб, стрелки – направления основных течений)

Разделение углеводов проводили методом статистического парового анализа согласно РД 52.24.473-95. Углеводородокисляющую активность штаммов исследовали на газовом хроматографе 6890 Plus с масс-селективным детектором 5973N (Agilent Technologies, USA). Кварцевая капиллярная колонка HP5-МС (30м x 0,25мм), газ-носитель – гелий, скорость потока 1мл/мин, диапазон сканирования масс 15-250 m/z, температура инжектора 260°C, без деления потока, температурная программа анализа: 40°C (3 мин.) – 10°C (1 мин.) – 260°C (10 мин.).

Для построения кривой роста бактерий определяли динамику численности последних по мутности культуральной среды на спектрофотометре при длине волны 540 нм. Продолжительность фаз роста определяли графическим методом (Шлегель, 1987).

Идентификацию микроорганизмов до рода проводили согласно критериям Определителя бактерий Берджи (1997) по совокупности культуральных, тинкториальных и биохимических свойств.

Молекулярно-генетическая идентификация выделенных нами НУО бактерий проведена Н. Л. Бельковой – к.б.н., ст.н.с. лаборатории микробиологии Лимнологического института СО РАН, Иркутск (Белькова и др., 2007). Для выделения ДНК были использованы общепринятые методы (Brosius et al., 1981; Денисова и др., 1999; Белькова, 2004). Секвенирование осуществляли на автоматическом секвенаторе Beckman Coulter CEQ 8800 Genetic Analysis System в Иркутском приборном центре коллективного пользования СО РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА III. Гидролого-гидрохимическая характеристика и микробные сообщества прибрежных вод юга о. Сахалин (2004–2006 гг.)

3.1. Гидролого-гидрохимическая характеристика прибрежных вод юга о. Сахалин как среды обитания для НУО микроорганизмов

Скорость и полнота разрушения НУ бактериями зависит от многих факторов: температуры, содержания растворенного кислорода и наличия в среде биогенных элементов (Миронов, 2002). В связи с этим в прибрежной зоне южной части о. Сахалин были проведены гидролого-гидрохимические исследования морской воды по таким параметрам как: температура, pH, соленость, абсолютное и относительное содержание растворенного в воде кислорода, биохимическое потребление кислорода за 5 суток, содержание биогенных элементов. Результаты исследований представлены за период с 2004 по 2006 гг. как средние данные, полученные в результате наблюдений по сезонам.

Температура. В наших исследованиях показано, что минимальные средние значения температуры наблюдались зимой в районе пос. Охотское (–1,6°C), являющегося прибрежной зоной открытого моря, максимальные – летом в б. Лососей и пос. Золоторыбное (+21,2°C, +22,15°C, соответственно) – районах мелководных акваторий, расположенных в залив Анива. Указанные температуры являются оптимальным для существования факультативных психрофилов или психротрофных микроорганизмов (Гусев, Коронелли, 1982).

Водородный показатель (pH). Средние значения pH среды (минимум, максимум) колебались в зависимости от сезона года: зимой – от 7,51 до 8,21; весной – от 7,46 до 8,14; летом – от 8,06 до 8,50; осенью – от 8,04 до 8,35. Летом и осенью средние значения pH были повышены по сравнению с зимой и весной, что подтверждается также и литературными данными (Алекин, 1966). Согласно данным литературы значения pH в районах исследования благоприятны для существования НУО микроорганизмов (Biological degradation..., 1994).

Соленость. Воды исследуемых районов обладали сходными значениями солености (30–33‰), за исключением весеннего периода, когда в результате разрушения ледяно-

го покрова и увеличивающегося стока рек соленость повсеместно уменьшалась (15–20%). Таким образом, большую часть года во всех указанных районах наблюдаются незначительные колебания солёности, что, как известно, благоприятно для существования НУО бактерий в морской среде (Shinichi, 1983).

Растворенный кислород. Воды прибрежной зоны исследуемых районов достаточно хорошо насыщены кислородом от 9,85 мг/дм³ до 12,67 мг/дм³, что соответствует требованиям для водоемов рыбохозяйственного назначения, концентрация растворенного в воде кислорода для которых не должна быть ниже 6 мг/дм³. Процентное насыщение вод кислородом составило от 95,23% до 129,46%, что, по данным других исследователей (Исследование экосистем..., 1992), вполне может обеспечивать постоянную активность процессов окисления нефти микроорганизмами во все сезоны года.

Биохимическое потребление кислорода за 5 суток (БПК₅). Присутствие органических веществ в среде стимулирует процессы деградации нефти и нефтепродуктов НУО микроорганизмами (Caruso et al., 2003). Как показали наши исследования, максимальные значения биохимического потребления кислорода были зафиксированы в летний период в портах Корсаков (4 мг/дм³) и Холмск (3,5 мг/дм³), в акватории которых попадают канализационные стоки этих городов, а также в б. Лососей (3,7 мг/дм³), куда впадает река Сусуя, собирающая неочищенные стоки нескольких населенных пунктов, включая г. Южно-Сахалинск.

Содержание минерального фосфора и аммонийного азота. Наиболее важными веществами, влияющими на интенсивность продукционно-деструкционных процессов в море, являются фосфор и азот (Исследование экосистем..., 1992). Присутствие данных биогенных элементов в водах исследуемых районов является необходимым условием для протекания процессов микробного окисления. Установлено, что минимальные значения минерального фосфора отмечались в б. Полякова и изменялись от 5,0 мкг/дм³ в весенний период до 12,1 мкг/дм³ – в зимний период; максимальные – в б. Лососей в летний период (до 149,6 мкг/дм³).

Таким образом, проведенные гидролого-гидрохимические исследования морской воды во всех изученных районах показали, что такие факторы среды, как температура, рН, солёность, БПК₅, необходимые биогенные элементы, в целом, не лимитируют развитие НУО микроорганизмов, а, следовательно, и окисление НУ.

3.2. Микробные сообщества, характеризующие органическое загрязнение прибрежных вод юга о. Сахалин (2004–2006 гг.)

Степень загрязнения среды органическими веществами можно охарактеризовать по численности таких эколого-трофических групп как гетеротрофные бактерии; бактерии группы кишечной палочки, обладающие высокой гидролитической активностью; НУО микроорганизмы; бактерии, расщепляющие липидные соединения и т.д. Поэтому задачей наших исследований было изучить структуру микробных сообществ прибрежных вод этих акваторий и выявить доминирующие группы.

Степень суммарного органического загрязнения прибрежных вод исследуемых районов оценивали по общей численности гетеротрофных микроорганизмов (ГОСТ 17.1.2.04-77), потребляющих готовые органические вещества.

Результаты исследований показали, что численность гетеротрофных бактерий на разных станциях варьировала в зависимости от сезона года. Так, в зимний период минимальная средняя численность гетеротрофных бактерий отмечена в прибрежной зоне пос. Охотское $83 \cdot 10$ кл/мл, максимальная – в порту Корсаков $65 \cdot 10^4$ кл/мл. Летний диапазон колебаний средней численности гетеротрофных микроорганизмов составил от $60 \cdot 10^3$ кл/мл (пос. Пригородное) до $45 \cdot 10^7$ кл/мл (порт Корсаков).

На основании определенной нами численности гетеротрофных бактерий, согласно ГОСТ 17.1.2.04-77, морские прибрежные воды по степени органического загрязнения

вблизи пос. Охотское в зимний период характеризуются как «чистые», в остальных районах – как «умеренно загрязненные» (пос. Пригородное, пос. Золоторыбное), - «загрязненные» (порт Холмск, б. Полякова) и - «грязные» (б. Лососей, порт Корсаков). В летний период года воды портов Холмск и Корсаков, а также б. Лососей соответствовали категории «очень грязные», воды остальных станций – «грязные».

Бактерии группы кишечной палочки. Практически для всех исследуемых районов характерно антропогенное загрязнение (канализационно-хозяйственные сточные воды, рекреационная нагрузка и т.д.), поэтому необходимо было дать санитарно-микробиологическую оценку прибрежным водам этих акваторий.

В прибрежной зоне пос. Охотское и б. Полякова бактерии группы кишечной палочки (БГКП) не обнаружены. В водах пос. Золоторыбное и пос. Пригородное кишечные бактерии выявлены только в весенний период в количестве 4 ± 1 и 7 ± 2 КОЕ/мл (колониеобразующих единиц) соответственно. Максимальная численность БГКП во все сезоны обнаружена в районе порта Корсаков, их среднегодовая численность находилась на уровне 220 ± 21 КОЕ/мл, и в районе порта Холмск – 82 ± 14 КОЕ/мл. В б. Лососей, также как и в портах, БГКП обнаруживались ежесезонно, но количество их было ниже и составляло 10 ± 2 КОЕ/мл. Результаты наших исследований, согласно санитарным нормам (Санитарные правила..., 1988), показали резкое превышение нормы кишечных бактерий в районе портов Корсаков, Холмск и б. Лососей во все сезоны года, а в пос. Пригородное и Золоторыбное весной.

НУО микроорганизмы. В ходе проведенных исследований было установлено, что максимальные значения численности НУО, мазутокисляющих и окисляющих дизельное топливо бактерий во все сезоны были отмечены в районах, подвергающихся наибольшему техногенному и антропогенному воздействию (порты Корсаков, Холмск и б. Лососей) (**рис. 2**). При этом доля НУО бактерий от общего числа гетеротрофов в летний период времени составляла от 60% (пос. Охотск) до 80% (пос. Золоторыбное), зимой - от 56% (б. Лососей, б. Полякова и пос. Пригородное) до 95% (порты Холмск, Корсаков).

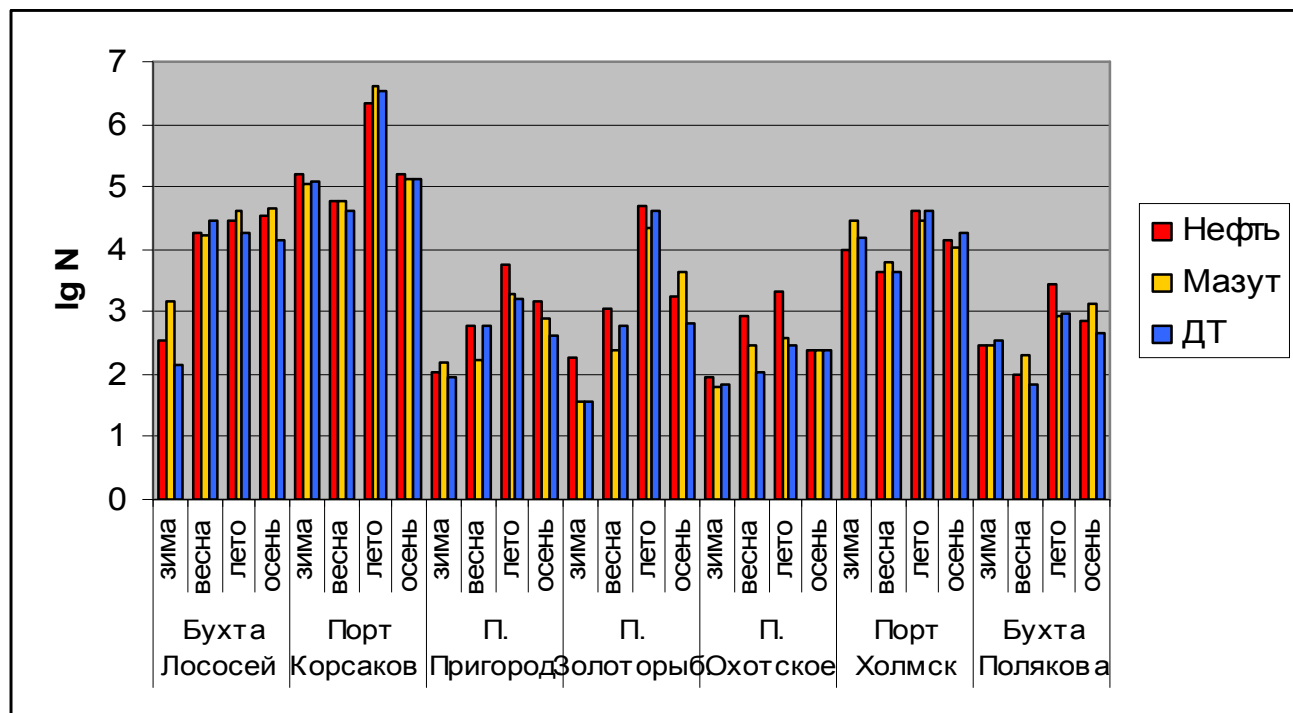


Рис. 2. Изменение средней численности НУО микрофлоры в морской воде по сезонам в 2004-2006 гг. (N – кл/мл)

Особого внимания заслуживают результаты, полученные для прибрежных вод пос. Золоторыбное, где численность НУО микроорганизмов практически сравнима с таковой в порту Холмск, хотя явные источники техногенного загрязнения на этой акватории отсутствуют. Можно предположить, что НУ могут поступать сюда с течением из порта Корсаков, б. Лососей и стоками р. Лютога. Кроме того, данный район испытывает высокую рекреационную нагрузку, так как здесь находится самый большой и популярный пляж в южной части о. Сахалин. За счет мелководья прибрежные воды прогреваются, что способствует размножению НУО микрофлоры. Средние минимальные значения численности НУО микроорганизмов во все сезоны наблюдали в районах пос. Охотское и б. Полякова, где не имеется как таковых заметных источников поступления НУ в морскую среду.

Возможно, что поступлению НУ в прибрежные воды пос. Охотское способствует Восточно-Сахалинское течение, а в водах б. Полякова могут присутствовать углеводороды биогенного происхождения. Следует отметить, что численность НУО микрофлоры была достаточно высокой и в зимний период времени, особенно в портах (Корсаков, Холмск), где присутствует хроническое органическое загрязнение, что говорит о психрофильности входящих в сообщество НУО микроорганизмов.

Численность липолитических микроорганизмов распределилась аналогично НУО микрофлоре.

Микробиологическая оценка последствий техногенной катастрофы у берегов о. Сахалин в 2004 г. Известно, что на колебания численности НУО микроорганизмов оказывают влияние аварийные разливы нефти (Мазур, 1997). Следующей задачей наших исследований являлось изучение изменения численности НУО микроорганизмов при существенном увеличении содержания нефтепродуктов в результате техногенного загрязнения морской среды (на примере крушения транспортного судна «Христофор Колумб»). Для оценки последствий загрязнения были отобраны пробы морской воды для микробиологического исследования через 3 дня и через 7 недель после разлива нефтепродуктов близ приморской набережной в г. Холмске.

Наиболее вероятная численность гетеротрофных микроорганизмов в б. Полякова и порту Холмск до разлива нефтепродуктов была одинаковой и составляла $2,5 \cdot 10^4$ кл/мл. Через три дня после крушения судна численность гетеротрофной микрофлоры возросла в этих районах на порядок, а непосредственно в районе разлива составила $2,5 \cdot 10^7$ кл/мл. Через 7 недель после происшествия, результаты обработки проб показали, что численность гетеротрофных микроорганизмов снизилась на порядок, по сравнению с предыдущими результатами. При этом ее значения были значительно выше даже среднемноголетних летних значений, полученных в последующие годы исследований. В отношении НУО микроорганизмов, были получены аналогичные данные (**рис. 3**). Численность НУО микроорганизмов возросла после аварии на один – два порядка. Значения выше исходных сохранялись даже по истечении 7 недель, что соответствует литературным данным (Цыбань, Симонов, 1978).

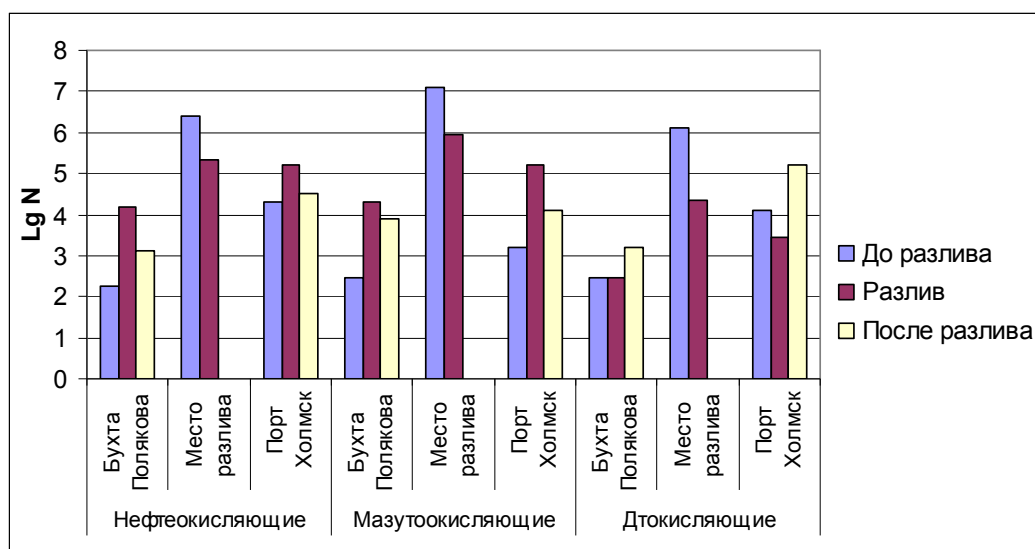


Рис. 3. Численность НУО микроорганизмов в морской воде при крушении судна «Христофор Колумб» в районе г. Холмска в сентябре 2004 г. (N – кл/мл)

В целом можно заключить, что акватория вдоль побережья г. Холмск испытала значительное загрязнение НУ при разливе нефтепродуктов. Это привело к увеличению численности НУО микроорганизмов (2005–2006 гг.) в 10–15 раз по сравнению с исходными значениями (до катастрофы), которая оставалась повышенной в районе порта и б. Полякова еще на протяжении двух лет (срок наблюдения).

ГЛАВА IV. Характеристика НУО способности микроорганизмов, выделенных из прибрежных вод юга о. Сахалин

4.1. Выделение НУО микроорганизмов

В исследуемых районах с 2004 по 2007 год всего было выделено 67 штаммов НУО микроорганизмов.

4.2. Культуральные свойства НУО бактерий

Для изучения характера роста исследуемых штаммов на НУ, использовали плотную среду МКД с добавлением 1% нефти и ее фракций: бензина, керосина, масел.

Все исследуемые штаммы, независимо от субстрата, по характеру роста колоний можно было разделить на 4 физиологические группы. 1-я группа микроорганизмов (23%) составили штаммы, дающие хороший рост и зоны просветления вокруг колоний. Во 2-ю группу (13%) вошли микроорганизмы, которые также хорошо росли на субстратах, но не образовывали зоны просветления вокруг колоний. 3-я группа (12%) микроорганизмов, наряду с хорошим ростом культуры, образовывала пигментированные колонии (темно-коричневый цвет). Для последней группы (52%) микроорганизмов был характерен слабый рост на изученных субстратах.

Таблица 1
Распределение штаммов бактерий из разных мест обитания, выросших на нефти, по физиологическим характеристикам роста

№№	Место отбора	Физиологическая группа			
		1	2	3	4
		номер штамма			
1	Пос. Пригородное	64,65, 20		031, 032	2, 041, 042, 55, 043, 62, 81

2	Порт Корсаков	85, 810, 96	410	86, 512, 513	1, 18, 021, 71, 72, 73, 731, 811
3	Бухта Лососей		514, 515, 517, 89		10, 13, 516
4	Пос. Золоторыбное	8, 12, 59, 715	43, 84	44	16, 41
5	Бухта Полякова	712, 511	711		5, 88
6	Порт Холмск	17, 87, 812		21	3, 4, 49, 510, 74, 77, 813, 76
7	Пос. Охотское		83	052	413, 414, 051, 69, 82,
Всего		15	9	8	35
		23%	13%	12%	52%
Итого		67			

Согласно данным литературы все, НУО бактерии по механизму проникновения поллютанта в клетку можно условно разделить на «микроорганизмы прямого контакта» и «микроорганизмы-эмульгаторы» (Гусев, Коронелли, 1982). Первые за счет гидрофобной поверхности легко вступают в контакт с каплей НУ и поглощают ее посредством пассивной диффузии. Вторые, не обладающие гидрофобной поверхностью, выделяют в среду метаболиты диспергирующие НУ и лишь потом усваивают их из водной эмульсии. В связи с этим, по характеру роста микроорганизмов на плотных средах, содержащих НУ, можно судить о механизме проникновения поллютанта в клетку. Так, микроорганизмы - эмульгаторы будут образовывать зоны просветления вокруг колоний, за счет диспергирования нефти. В противоположность этому, «микроорганизмы прямого контакта» и НУ устойчивые бактерии таких зон не образуют. Таким образом, бактерии 1-ой физиологической группы, составляющие 23% от общего числа культур, выросших на НУ, по механизму проникновения поллютанта в клетку следует отнести к «микроорганизмам-эмульгаторам».

4.3. Визуальная оценка разложения НУ исследуемыми штаммами в модельном эксперименте

С целью исследования нефтеокисляющей способности бактерий трех выделенных нами физиологических групп, был поставлен эксперимент, в котором разложение нефти микроорганизмами оценивалось методом визуализации по 4-х крестной системе (ZoBell, 1973). Так, по результатам эксперимента 24% исследуемых штаммов полностью разлагали НУ в течение 3-х недель (++++), 33% штаммов - в течение 4-х недель (+++). За те же четыре недели 15% штаммов плохо разлагали НУ (++) и 28% - очень плохо (+). Следовательно, 57% штаммов коллекции хорошо разлагали НУ, а 43% – слабо.

По активности разложения НУ внутри физиологических групп культуры распределились неравномерно (табл. 2).

Таблица 2

Распределение культур по степени деградации нефти внутри физиологических групп НУО микроорганизмов (%)

деградация группы	"+"	"++"	"+++"	"++++"
1	-	-	20	80
2	-	10	67	23
3	-	-	75	25
4	54	26	20	-

Так, наибольшее количество штаммов, разлагающих нефть за 3 недели (++++), относились к первой физиологической группе, а большая часть культур слабо утилизирующих нефть (+) и (++) – к четвертой. Во второй и третьей группах в большинстве своем оказались штаммы, разлагающие НУ на три плюса. При этом наибольшей гетерогенностью в отношении НУО активности обладали 2-я (от ++ до +++) и 4-я группа (от + до +++).

4.4. Молекулярно-генетическая идентификация НУО бактерий

Идентификация «активных» штаммов (++++) показала, что видовой состав НУ окисляющих микроорганизмов сахалинской коллекции имеет свои особенности. Так, нами не обнаружены наиболее активные, по данным литературы, нефтеокислители – бактерии родов *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*. Это вполне объяснимо, поскольку указанные микроорганизмы обладают липофильной поверхностью и, как правило, встречаются в районах с сильным нефтяным загрязнением, где содержание НУ составляет > 1 г/л (нефтяная пленка на поверхности воды) (Meуer, Schwartz, 1970a, b). В большинстве исследованных нами районах независимо от сезона нефтяная пленка на поверхности воды отсутствовала.

Из всех видов НУО микроорганизмов, описанных в литературе, нами выделены только псевдомонады. Они составляют 25% всех «активных» НУ окислителей. Представители других, выделенных нами родов (*Thalassospira*, *Pseudoalteromonas*, *Oceanisphaera*), а также видов (*Pseudoalteromonas citrea*, *Pseudoalteromonas elyakovii*, *Halomonas marina*), впервые отнесены к НУО бактериям. Наиболее массовыми из них были *Halomonas marina* (20%) и бактерии рода *Pseudoalteromonas* (31%). Если учесть, что они также эффективно, согласно нашим данным, утилизируют НУ как традиционно известные псевдомонады, то – это существенно расширяет список известных НУО микроорганизмов.

4.5. Характеристика НУО способности штаммов разных физиологических групп

НУО штаммы (выборочно из разных физиологических групп): 87, 715, 85, 59, 8 (1-я группа), 410, 83 и 21, 031 (2-я и 3-я, соответственно), 73, 10, 81 (4-я группа) культивировали на смеси НУ, в состав которой входили алканы, циклоалканы, арены.

Среду с НУ инокулировали указанными штаммами и культивировали при комнатной температуре в течение 30 дней. Через определенные сроки одномоментно снимали спектрофотометрические показатели (для построения кривой роста бактерий) и хроматографические показатели изменения концентрации НУ в среде.

Как видно из данных **рисунка 4**, штаммы 1-й физиологической группы (штаммы 59 и 8), которые были идентифицированы как бактерии рода *Pseudomonas*, практически полностью утилизировали все углеводороды из смеси, 2-й (штамм 410) и 3-й (штамм 21) групп также хорошо усваивали НУ, по сравнению с контролем, но хуже, чем штаммы 1-й группы.

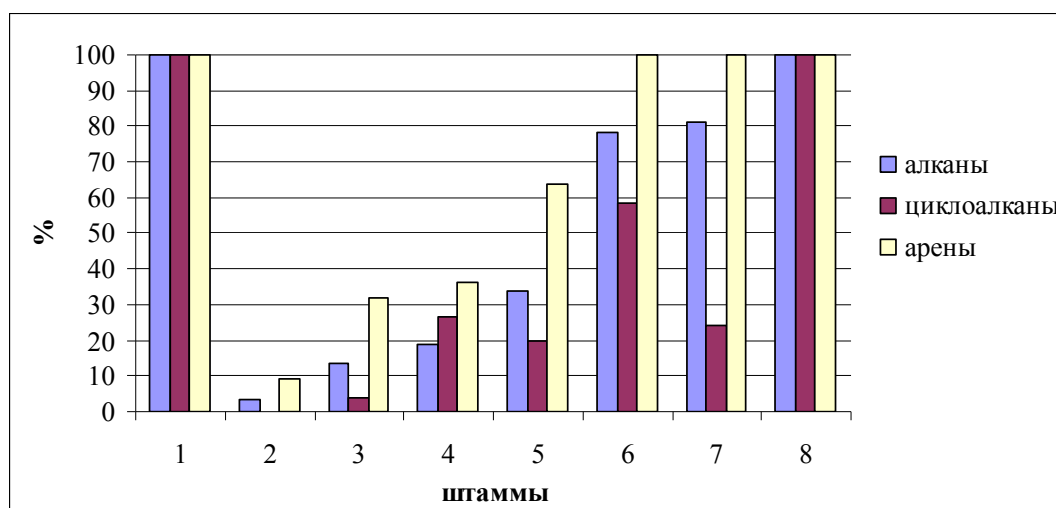


Рис. 4. Утилизация НУ бактериями разных физиологических групп за 30 суток. 1 – контроль, 2 – штамм 59 (++++), 3 – штамм 8 (++++), 4 – штамм 21 (+++), 5 – штамм 410 (+++), 6 – штамм 10 (++) , 7 – штамм 81 (+++), 8 – штамм 73(+)

Судя по кривым роста, бактерии 2-й группы менее активно размножались на НУ, по сравнению с 1-й, что соответствовало усвоению субстрата (**рис.5**). По-видимому, штаммы этих групп реализуют различные механизмы потребления НУ. Несмотря на указанные различия, и те и другие, безусловно, используют НУ как единственный источник углерода и энергии. Поскольку существенных отличий характера нефтеокисления у бактерий 2-й и 3-й физиологических групп не было обнаружено, они объединены в одну группу.

Штаммы 4-ой физиологической группы (штаммы 73, 10, 81), которые плохо росли на субстрате (**рис. 5**), отличались гетерогенностью по способности разлагать НУ. Половина из них не утилизировали субстрат и были отнесены к НУ устойчивым. Остальные усваивали только циклоалканы и алканы. В отличие от кривых роста штаммов других групп, здесь очень выражена фаза адаптации, что говорит о приспособлении культуры к условиям не вполне комфортным для размножения.

По-видимому, штаммы, отнесенные нами к разным физиологическим группам по характеру роста на нефти и ее утилизации, обладают разными механизмами разложения НУ. На наш взгляд требуется более глубокое изучение качественных и количественных характеристик ферментов, участвующих в процессе деградации НУ, а также липидов, входящих в состав клеточной стенки бактерий.

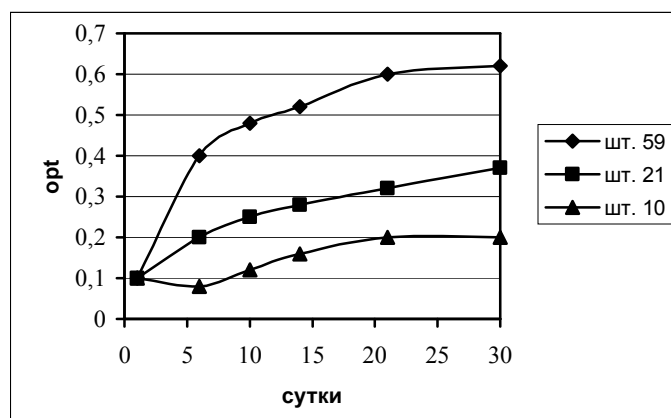


Рис. 5. Размножение бактерий разных физиологических групп на смеси НУ: штамм 59 (1-я группа); штамм 21 (3-я группа); штамм 10 (4-я группа)

Таким образом, в сообществах НУО микроорганизмов прибрежных вод юга о. Сахалин принципиально можно выделить три группы, которые отличались разным характером роста на НУ и способностью к их разложению. Так, 1-ю группу составили НУО «микроорганизмы – эмульгаторы» (23%), 2-ю – НУО «микроорганизмы прямого контакта» (49%), а 3-ю – НУ устойчивые микроорганизмы (28%). Полученные результаты можно использовать для скрининговых исследований по поиску новых штаммов-ремедиантов.

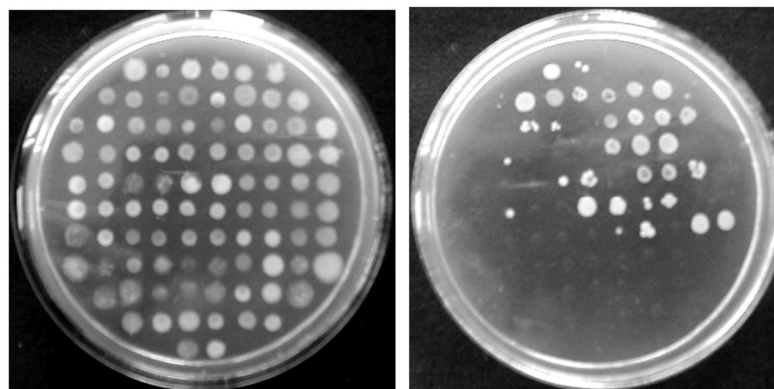
ГЛАВА V. Сравнительные исследования биологических свойств НУО бактерий, выделенных из прибрежных акваторий с разным характером загрязнения (южная часть Приморского края и о. Сахалин)

Известно, что на процессы утилизации микроорганизмами НУ оказывают существенное влияние абиотические факторы среды (температура, кислород, соединения фосфора, азота и т.д.) в оптимальных пределах которых и рекомендуется использовать НУО микроорганизмы (Biological degradation..., 1994). Поэтому одной из поставленных задач исследования являлось сравнение биологических свойств НУО штаммов микроорганизмов, выделенных из прибрежных акваторий о. Сахалин и южной части Приморского края.

Микроорганизмы выделяли из акваторий, отличающихся типом и уровнем загрязнения (районы активного морского судоходства и скопления морских транспортных средств): Японское море – б. Золотой Рог (36-й причал), б. Находка (порт) и Охотское море – залив Анива (порт Корсаков).

Из прибрежных вод исследуемых морских акваторий было выделено 112 устойчивых к нефти штаммов: 36 штаммов – б. Золотой Рог, 39 штаммов – б. Находка, 37 штаммов – залив Анива.

Определяли минимальные ингибирующие концентрации НУ. Концентрация НУ 6% была определена как предельная ингибирующая, при которой выживали 1/3 культур бактерий. На средах с концентрацией НУ 2% выросли практически все штаммы б. Золотой Рог, а наиболее чувствительными к повышению концентрации поллютанта в среде оказались штаммы, выделенные из залива Анива (**рис. 6**). Доля штаммов, выросших на средах с предельной ингибирующей концентрацией (6%), была максимальной в б. Золотой Рог, несколько меньшей – в б. Находка и минимальной – в заливе Анива. При этом наиболее гетерогенной группой по чувствительности к изменению концентрации НУ оказались бактерии бухт Золотой Рог и Находка, доля которых с увеличением количества поллютанта значительно уменьшалась. Более устойчивыми к высоким концентрациям НУ были штаммы из залива Анива. Полученные результаты адекватно отражают ситуацию в исследуемых акваториях, которые по степени загрязнения НУ можно расположить в следующий ряд: б. Золотой Рог > б. Находка > залив Анива.



а

б

Рис. 6. Рост тестируемых штаммов на селективной среде с добавлением флотского мазута как единственного источника углеродного питания в количестве 2% (а) и 6% (б) от объема среды

Как показали результаты, штаммы из залива Анива оказались менее всего устойчивыми к действию тяжелых металлов (табл.3).

Таблица 3

Устойчивость НУО микроорганизмов разных районов исследования к тяжелым металлам

Район исследований	Доля штаммов, %					
	Pb	Cd	Cu	Zn	Co	Ni
Бухта Золотой Рог	50	58,3	-	69,4	50	58,3
Бухта Находка	79	79	-	53,8	53,8	58,9
Залив Анива	10,8	24,3	5,4	5,4	5,4	5,4

Как видно из данных **таблицы 4**, число НУО штаммов, выделенных из б. Золотой Рог, обладающих гидролитической активностью в отношении всех исследуемых субстратов, было больше, по сравнению со штаммами из залива Анива и б. Находка. Количество штаммов, обладающих высокой гидролитической активностью, выделенных из вод залива Анива также было достаточно высоким.

Таблица 4

Гидролитическая активность НУО микроорганизмов разных районов исследования

Район исследований	Доля штаммов, %		
	Протеолитики	Липолитики	Амилолитики
Бухта Золотой Рог	60	80	30
Бухта Находка	34	15,8	15
Залив Анива	44,4	51,3	21,1

Сравнительный анализ свойств штаммов, выдерживающих 6% концентрацию НУ, представленный в сводной **таблице 5**, дает возможность косвенно определить характер загрязнения морских вод, из которых они были выделены. Так, штаммы из залива Анива были чувствительны к высоким концентрациям тяжелых металлов, но обладали набором ферментов, разлагающих легкодоступные органические субстраты.

Таблица 5

Биологические свойства бактерий, устойчивых к 6%-ной концентрации нефти

Район обнаружения	№ штамма	Устойчивость к тяжелым металлам						Наличие экзоферментов		
		Pb ⁺	Cd ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Co ²⁺	Ni ⁺	амилаза	протеиназа	липаза
Бухта Золотой Рог	101	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	103	+	+		+		+		+	+

	110	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	114	+	+		+	+	+		+	+
	115	+	+			+		+	+	+
	118	+	+	+		+	+	+	+	+
	122	+		+	+	+	+	+	+	+
	123	+	+	+	+		+		+	+
	126	+				+	+	+	+	+
	128	+			+	+		+	+	+
	129	+	+	+	+		+			+
	131	+		+	+	+		+	+	+
	133	+	+	+	+		+	+	+	+
	135	+	+	+	+	+		+	+	+
Залив Анива	204									+
	207								+	+
	214	+						+	+	
	216							+		+
	218			+					+	+
	221							+	+	
	227				+			+		+
	229								+	+
	230	+		+				+		+
	232							+	+	
	233								+	+
	235				+			+		
	236							+	+	+
	238								+	+
Бухта Находка	304	+	+		+	+	+			
	308	+	+		+	+	+			
	310	+	+		+				+	
	311	+			+	+	+	+		
	318	+	+			+	+	+	+	+
	322	+	+			+	+			
	326	+	+		+	+			+	+
	329	+	+		+	+	+			
	335	+	+		+		+			

Бактерии б. Находка характеризовались высокой устойчивостью к НУ и тяжелым металлам и в меньшей степени обладали ферментами, утилизирующими легкодоступные полимерные субстраты, так как бухта испытывает в основном техногенное воздействие. Штаммы НУО микроорганизмов из вод б. Золотой Рог со смешанным загрязнением проявляли высокую устойчивость как к НУ, так и к тяжелым металлам, а также обладали высокой гидролитической активностью.

Таким образом, штаммы коллекции разных акваторий Дальневосточного региона, обладали разными биологическими свойствами: способностью выдерживать высокие концентрации тяжелых металлов, НУ, гидролизовать легкоразлагающиеся органические вещества.

ВЫВОДЫ

1. Морские прибрежные воды юга о. Сахалин на основании изучения численности гетеротрофных микроорганизмов, характеризующих органическое загрязнение, можно отнести к категории «грязные», особенно в теплые месяцы года. Наиболее высокая численность гетеротрофов определена в прибрежных водах портов Корсаков, Холмск, в б. Лососей и у пос. Золоторыбное.

2. Установлено, что в морской воде всех районов исследования в гетеротрофных сообществах, характеризующих органическое загрязнение, доминируют психрофильные НУО микроорганизмы.

3. Показано, что на численность бактерий в сообществах морских микроорганизмов оказывают влияние аварийные разливы нефтепродуктов. При этом доля НУО микроорганизмов повышается, и изменения сохраняются на протяжении более чем двух лет (срок наблюдения).

4. В сообществах НУО микроорганизмов прибрежных вод юга о. Сахалин определены три физиологические группы, которые отличаются разным характером роста на НУ. Штаммы первой группы являются наиболее активными деструкторами НУ и могут быть рекомендованы в качестве биоремедиаторов среды.

5. На примере коллекции штаммов, выделенных из прибрежных вод юга о. Сахалин, показана гетерогенность сообщества микроорганизмов по способности к окислению НУ. Треть из них являются нефтеустойчивыми (28%), остальные – нефтеуглеводородокисляющими, из которых большая часть реализует контактный механизм поглощения углеводородов (49%), а остальные – механизм эмульгирования субстрата (23%).

6. Установлено, что штаммы морских микроорганизмов родов *Thalassospira*, *Pseudoalteromonas*, *Oceanisphaera*, а также виды *Pseudoalteromonas citrea*, *Pseudoalteromonas elyakovii*, *Halomonas marina* являются нефтеокислителями.

7. Показано, что НУО микроорганизмы, выделенные из районов с разной степенью и характером загрязнения, отличаются различной способностью выдерживать высокие концентрации тяжелых металлов, НУ, гидролизовать легкоразлагающиеся органические вещества.

8. Использование аборигенных штаммов для биоремедиации морской среды наиболее целесообразно, так как при этом повышается эффективность деструкции НУ за счет сокращения времени адаптации микроорганизмов не только к факторам среды, но и к загрязняющим веществам.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах

1. Бузолева Л.С., Смирнова М.А., Безвербная И.П. Биологические свойства морских нефтеуглеводородокисляющих бактерий из прибрежных акваторий дальневосточных морей с разным характером загрязнения // Известия ТИНРО. – 2008. – Т 155. – С. 210-218.

Работы, опубликованные в материалах всероссийских и международных конференций

2. **Smirnova M.A.** Microbial indication of ecological conditions along the Aniva Bay coast // North Pacific Marine Science Organization (PICES). Twelfth Annual Meeting: Program abstracts. – Seoul, 2003. – С. 21-22.

3. **Смирнова М.А.** Использование метода предельных разведений для оценки загрязнения в заливе Анива (Сахалин) // Тез. докл. VII Регион. конф. студентов, аспирантов, молодых преподавателей и сотрудников вузов и научных организаций ДВ России по акту-

альным проблемам экологии, морской биологии и биотехнологии. – Владивосток, 2004. – С. 103.

4. Buzoleva L.S., Bezverbnaya I.P., Babich T.V., **Смирнова М. А.**, Terehova V.E. Biological control of environment or far eastern north-east coast // Program and abstracts Third International Symposium on the Arctic Research. – Tokyo, Japan, 2005. – С. 78.

5. Калитина Е.Г., Анисимова Н.И., Бабич Т.В., **Смирнова М. А.**, Дегтярева В.А., Бузолева Л.С. Оценка экологического состояния бухты Золотой Рог г. Владивостока с помощью методов микробной индикации // «Здоровье семьи – 21 век: материалы IX Международной науч. конф. – Далянь: Изд-во ПОНИЦАА, 2005. – С. 142-144.

6. **Смирнова М. А.** Некоторые результаты изучения динамики индикаторов загрязнения прибрежных акваторий юга Сахалина в 2004 г. // «Здоровье семьи – 21 век: материалы IX Международной науч. конф. – Далянь: Изд-во ПОНИЦАА, 2005. – С. 302-303.

7. **Смирнова М. А.** Микробиологическая оценка последствий катастрофы судна «Христофор Колумб» у берегов острова Сахалина // Тез. докл. I (XIX) Международной конф. молодых ученых «Изучение природных катастроф на Сахалине и Курильских островах». – Южно-Сахалинск, 2006. – С. 139-140.

8. **Смирнова М. А.** Предварительные результаты микробиологических исследований морского льда в прибрежной зоне заливов Мордвинова и Анива (Южный Сахалин) в 2004-2007 гг. // Тез. докл. II (XX) Международной конф. молодых ученых «Природные катастрофы: изучение, мониторинг, прогноз». – Южно-Сахалинск, 2007. – С. 88-89.

9. **Смирнова М. А.** Характеристика культуральных свойств морских микроорганизмов (выделенных из прибрежных вод юга острова Сахалин), выросших на нефти и ее фракциях // Тез. Докл. 2-го Байкальского Микробиологического Симпозиума с международным участием «Микроорганизмы в экосистемах озер, рек, водохранилищ». – Иркутск: Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2007. – С. 209.

10. Белькова Н. Л., Бузолева Л. С., **Смирнова М. А.** Молекулярно-генетическая идентификация микроорганизмов // Тез. докл. 2-го Байкальского Микробиологического Симпозиума с международным участием «Микроорганизмы в экосистемах озер, рек, водохранилищ». – Иркутск: Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2007. – С. 25.

11. **Смирнова М. А.** Методы изучения биохимической активности нефтеокисляющих штаммов дальневосточных морей // Материалы второй международной микробиологической школы «Микробиологические методы в экологических исследованиях». – Владивосток, 2007. – С. 94-104.

12. Бузолева Л. С., Безвербная И. П., Дворник А. А., **Смирнова М. А.**, Литвинова Н.Г. Эколого-микробиологическая оценка состояния прибрежных вод г. Владивостока // Материалы XIII Международная науч. конф. «Здоровье семьи – XXI век». – Хургада, Египет, 2009 – С. 110-114.