

РГБ ОД

18 ДЕК 2000

На правах рукописи



Дроздовская Олеся Андреевна

**Поиск микроорганизмов - индикаторов
и деструкторов фенолов в прибрежных
водах дальневосточных морей**

Специальность 03. 00. 16 - экология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток 2000

Работа выполнена на кафедре общей экологии Дальневосточного
государственного университета

Научные руководители:

д. б. н., профессор Н.К. Христофорова

д. б. н., доцент Г.Ю. Димитриева

Официальные оппоненты:

д. б. н., с. н. с. З. И. Никитина

к. б. н., с. н. с. Л.С. Бузолева

Ведущее учреждение: Институт водных и экологических
проблем ДВО РАН

Защита состоится « 23 » декабря 2000 г. в 13 часов на заседании
диссертационного совета Д 064.58.01 при Дальневосточном государственном
университете по адресу: 690600, г. Владивосток, ул. Мордовцева, 12, комн. 139.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Дальневосточного
государственного университета

Автореферат разослан «27» ноября 2000 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор биологических наук



Т. А. Комарова

F 082.154.21с6, 0

E 082.34с, 0

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Одной из актуальнейших проблем современности является проблема загрязнения Мирового океана (Израэль, Цыбань, 1989). В приоритетных списках загрязняющих природные воды веществ на одном из первых мест стоят фенолы, что объясняется их высокой токсичностью и большим объемом мирового производства (Никитин, Новиков, 1980). Основными источниками загрязнения фенолами морских прибрежных вод являются предприятия целлюлозно-бумажной, деревообрабатывающей и нефтеперерабатывающей промышленности. Кроме того, фенолы могут отражать загрязнение вод хлорорганическими пестицидами, а также иметь фекальную природу. Дальний Восток – регион лесных ресурсов, добычи и транспортировки нефти, поэтому актуальность проблем, связанных с загрязнением прибрежных вод фенолами, не вызывает сомнений. В связи с этим разработка эффективных методов своевременного оперативного контроля состояния, а также защиты и восстановления прибрежной среды становится все более актуальной. Важное место при этом занимают бактериологические методы, с помощью которых оценивают количество микроорганизмов, состав основных физиологических групп, их распределение и свойства (Janase et al., 1992; Voinovic Milorodov et al., 1992; Дмитриева, 1995; Дмитриева и др., 1997; Дроздовская, Черемисинова, 1997). В мировой практике имеется достаточное количество работ по микробиологической индикации ароматических соединений в морской среде, однако микробная диагностика фенольного загрязнения морской среды остается слабо изученным направлением. Совершенно неизученной эта проблема является для прибрежных морских вод российского Дальнего Востока.

Являясь индикаторами фенольного загрязнения, микроорганизмы одновременно разлагают этот субстрат, выполняя деструкционную роль и участвуя в процессах самоочищения моря. Многие исследователи ведут поиск таких деструкторов (Дивавин, Копытов, 1977; Цыбань и др., 1990; Janase et al.,

1992 и др.), и все-таки задача до конца остается не разрешенной, поскольку существуют проблемы с интродукцией штаммов в естественную среду. Как оказалось, перспективными в этом плане могут быть морские водоросли, образующие естественные пояса вдоль побережья и их ассоциативные микроорганизмы, деструктивный потенциал которых практически не изучен.

Цель и задачи работы

Цель исследований заключалась в следующем: выявить основные закономерности развития микробных сообществ в условиях фенольного загрязнения, рассмотреть их значимость для мониторинга и установить их роль в стабилизации морских экосистем.

Для достижения поставленной цели были определены и последовательно решались следующие задачи:

1. С помощью методов микробной индикации дать характеристику экологического состояния ряда экономически важных акваторий в условиях фенольного загрязнения.
2. Изучить структуру микробных биоценозов прибрежных морских вод в фоновом и загрязненных фенолами районах дальневосточных морей.
3. Определить деструктивный потенциал природных морских микробных сообществ и установить некоторые закономерности процесса обезвреживания ими фенола.

Научная новизна и практическая значимость работы

Проведено изучение структуры и свойств микробных сообществ в условиях фенольного загрязнения в Авачинском заливе, на юго-западном и северо-восточном побережьях Сахалина, у берегов Северного и Южного Приморья. Установлено, что планктонные микроорганизмы формируют специфические фенолрезистентные группы, численность микроорганизмов в которых соответствует концентрации фенола в морской среде.

Результаты позволили выработать единые химико-бактериологические критерии качества морских вод, оценить экологическое состояние морской среды и уровень содержания фенолов в прибрежных районах.

Таким образом, показана новая перспектива использования микробной индикации для экспресс-оценки, мониторинга и кратковременного прогноза изменения состояния морской прибрежной среды.

Впервые установлены критерии загрязнения фенолами. Выделены категории «чисто» (фон) – ниже ПДК, «небольшое превышение фона» – на уровне ПДК, «ощутимое загрязнение» – до 3 ПДК, «значительное загрязнение» – примерно 4-10 ПДК, и «очень сильное загрязнение» – более 10 ПДК.

В результате предложен эффективный метод микробной индикации, который отличается относительной простотой, экспрессностью, дешевизной, доступностью и позволяет систематически осуществлять мониторинг фенольного загрязнения в лабораториях, контролирующим загрязнение.

Получены сведения о самоочищающей способности морской прибрежной среды. Выявлено такое вместилище природных деструкторов фенола, как ламинариевые водоросли, ассоциативная микрофлора которых обладает активным ферментативным комплексом, разрушающим фенол, который активизируется при УФ-облучении.

Эти сведения могут быть использованы при разработке методов доочистки прибрежных морских вод Дальневосточного региона. Кроме того, для интенсификации процесса доочистки может быть рекомендовано искусственное осеменение ламинариевых плантаций ее собственной, но активированной микрофлорой.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В условиях фенольного загрязнения прибрежной морской среды происходит незамедлительная реакция микробных биоценозов, которая выражается в изменении как количественного, так и качественного состава сообществ. Эта ответная реакция настолько тесно связана с изменением экологического состояния, что микробные сообщества могут рассматриваться как индикаторы загрязнения фенолами.

2. Микроорганизмы – существенный компонент морских экосистем, выполняющий функции стабилизации. Способность микроорганизмов к

быстрой адаптации позволяет им в качестве источника углерода использовать самые разнообразные органические вещества, в том числе и фенолы, что обеспечивает процесс самоочищения морских прибрежных вод от данного загрязнителя. Скорость этого процесса зависит от концентрации фенола, состава среды, температуры и наличия ко-деструктора.

Апробация результатов диссертации

Основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на Международной Конференции «Северная Пацифика...» (Владивосток, 1994), на общеуниверситетской конференции ДВГУ (1995), Конференции молодых ученых ТИНРО «Биоресурсы морских и пресноводных экосистем» (Владивосток, 1995), Азиатско-Тихоокеанской конференции «Наука и управление прибрежной средой» (Гонг-Конг, 1996), III Дальневосточной конференции по заповедному делу (Владивосток, 1997), Конференции молодых ученых ТИНРО «Биомониторинг и рациональное использование гидробионтов» (Владивосток, 1997), Международном симпозиуме «Сохранение среды Японского моря» (Канава, Япония, 1997), семинаре кафедры общей экологии Дальневосточного государственного университета (2000), IV Региональной конференции молодых ученых «Проблемы экологии и рационального природопользования Дальнего Востока» (Владивосток, 2000).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 работ.

Объем и структура диссертации

В основу настоящей диссертационной работы положены исследования автора (1993-1999) и использованы материалы, полученные в совместных опытах с д. б. н. Г. Ю. Дмитриевой.

Работа изложена на 156 страницах. Она состоит из введения, краткого литературного обзора, содержит информацию о районах исследования, объектах и методах исследований, включает результаты и их обсуждение, список цитируемой литературы, состоящий из 170 источников, а также приложение. Диссертация иллюстрирована 19 рисунками и 23 таблицами.

Автор искренне благодарен за всемерную поддержку и помощь своим руководителям д. б. н. Г. Ю. Дмитриевой и д. б. н., профессору Н. К. Христофоровой, к. б. н. Л.С. Шевченко (ТИБОХ ДВО РАН) а также всем наставникам и коллегам, уделившим внимание обсуждению работы и оказавшим помощь в проведении исследований.

Финансовая поддержка при выполнении работы была оказана Городским комитетом по охране природы.

2. РАЙОНЫ РАБОТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальные работы проводились на морских микроорганизмах (МММ) из коллекции Дальневосточного государственного университета, выделенных из морской воды, грунтов и ламинариевых водорослей, отобранных в зал. Петра Великого (Амурский залив, предутье р. Туманной, бухты Сивучья и Экспедиции, зал. Посыета), в Северном Приморье – бухте Рудной, у берегов Камчатки в Авачинском заливе, на юго-западе Сахалина у побережья г. Холмска, на северо-востоке Сахалина в заливах Ныйском, Набиль, Чайво, (рис. 1).

На всех станциях были исследованы пробы морской воды. В бухте Бражникова (Амурский залив) для исследования брали также донные осадки. Ламинарию японскую *Laminaria japonica* и ламинарию цикорисподобную *L. sichotoides* собирали соответственно у о-вов Верховского и в б. Муравьиной в заливе Петра Великого.

Залив Петра Великого лежит в пределах высокопродуктивного шельфа с уникальным сообществом животных и растений. Здесь располагается единственный в России Государственный морской заповедник. В северо-западной части залива находятся Амурский и Уссурийский заливы, которые подвергаются сильному воздействию водно-коммунальных, промышленных и сельскохозяйственных стоков города Владивостока и других населенных пунктов. В юго-западной части зал. Петра Великого большую часть года экологическая ситуация определяется влиянием реки Туманной, на которой



Рис. 1. Дальневосточный регион России

Римскими цифрами обозначены основные районы

исследования

расположены целлюлозно-бумажные комбинаты, являющиеся сильными загрязнителями среды фенолами (Прозорова, Кавун, 1999)

Бухта Рудная находится на северо-западном побережье Японского моря. Данный район относится к территориям с неблагоприятной экологической обстановкой. На берегу б. Рудной в поселке Рудная Пристань находятся свинцово-плавильный завод и небольшой порт.

Авачинская губа, расположенная на юго-восточном побережье Камчатского полуострова, испытывает сильное антропогенное воздействие. В данном районе сосредоточены судоремонтный завод, рыбный порт, военные базы и многочисленные места захоронения различных химических веществ.

В г. Холмске, расположенном на берегу Татарского пролива на юго-западе Сахалина, действует целлюлозно-бумажный завод. Также прибрежные воды г. Холмска испытывают влияние Цусимского течения, которое приносит с юга, от западных берегов Японии различные загрязняющие вещества.

Заливы Ныйский, Набиль и Чайво, находящиеся на северо-востоке Сахалина, фактически являются лагунами и характеризуются высокой биологической продуктивностью, хотя локально подвержены воздействию береговых стоков, загрязненных нефтяными углеводородами и пестицидами.

Объектами исследований помимо морских микроорганизмов служили:

1) микроорганизмы из коллекции Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН: *Bacillus subtilis* КММ 430, *Escherichia coli* К 12, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 21027, *Candida albicans* КММ 45, которые использовались в качестве тест-объектов в различных реакциях.

2) растительные объекты: традесканция белоцветковая *Tradescantia albiflora*, семена и проростки редиса посевного *Raphanus sativus*. На этих организмах определяли биологический эффект микробных метаболитов.

Выделение и идентификацию микроорганизмов, определение их гидролитических способностей проводили по общепринятым методикам (Методы общей бактериологии..., 1984; Bergey's manual..., 1984; 1986; 1994;

Определитель бактерий Берджи, 1997). Морфологию бактерий наблюдали в световой микроскоп. Выращивание микроорганизмов проводили в условиях периодического культивирования на жидких или агаризованных средах.

В работе использовали элективные питательные, обедненные («минимальные») и дифференциально-диагностические среды. В качестве питательных использовали среду для морских микроорганизмов – СММ (Youshimizu, Kimura, 1976), рыбопептонный агар (РПА) или бульон (РПБ), бульон Хоттингера (Лабинская, 1978). Среди обедненных сред были выбраны минеральная среда с 0,1 % дрожжевым экстрактом – (ЭС) (Дмитриева, 1995), среда Гловера (Метаболизм микроорганизмов..., 1986). Дифференциально-диагностическими служили: среда Хью-Лейфсона и среда А (Егоров, 1983). Кинетику роста бактериальных культур в жидких средах определяли методом Коха путем высева аликвоты суспензии бактерий из десятикратных разведений на поверхность агаризованной среды через часовые или суточные интервалы и последующей оценки количества колоний культивируемых гетеротрофных микроорганизмов. Параллельно для определения концентрации микроорганизмов использовали стандарт мутности $5 \cdot 10^8$ кл/мл.

Деструкторы фенольных соединений из морской воды и донных осадков выделяли на среде ЭС с добавлением фенола в концентрациях 0, 1 % и 1 %. Детоксикацию бактериями фенола изучали на бедных и богатых средах, а также на искусственной (ИМВ) (Методы общей бактериологии, 1984) и натуральной морской воде (МВ) из района морского заповедника. Опыты проводили при 4°C, 10°C, 20°C и 32°C. Для получения более активных деструкторов применяли УФ-мутагенез (Метаболизм микроорганизмов, 1986).

Токсичность культуральной среды с поллютантом определяли по цитофизиологическим тестам: скорости движения и физическому состоянию цитоплазмы у клеток тест-организмов - растений (Ковтун, 1984), а также по числу проросших семян (Бабьева, Зезова, 1983). В зависимости от скорости и обратимости процессов выделяли категории: «очень токсично», «токсично», «не токсично», что соответствовало времени жизни тест-клеток соответственно 0-2

ч, более 2 ч, более 5 ч. Концентрацию фенола в среде определяли спектрофотометрически (СФ – 46) при длине волны 272 Нм. Калибровочную кривую строили для водного раствора фенола. Идентификацию фенола в среде проводили методом высокоэффективной газожидкостной хроматографии на хроматографе Shimadzu (Япония) с УФ-детектором при длине волны 270 Нм. Использовали стандартную колонку FCL-ODS: длина – 1 м, диаметр – 2 мм, скорость потока 2 мл/мин., подвижная фаза: изопропанол-вода.

3. МИКРОБНАЯ ИНДИКАЦИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ МОРСКОЙ ПРИБРЕЖНОЙ СРЕДЫ ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ МОРЕЙ В УСЛОВИЯХ ФЕНОЛЬНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

В процессе исследования изучалась структура и свойства планктонных микробных ассоциаций. Наиболее подходящим признаком для целей микробной индикации фенольного загрязнения оказалась численность фенолустойчивых планктонных микроорганизмов. При этом микробиологические показатели адекватно отражали химико-экологическую ситуацию обследованных районов.

Микробная индикация показала, что вся акватория Авачинской губы сильно загрязнена фенолами (табл. 1). По имеющимся данным, основной источник поступления загрязняющих веществ, в том числе и фенольной природы в прибрежные воды Авачинского залива – речной сток (Шапоренко, 1997). Таким образом, одной из причин фенольного загрязнения является влияние рек Паратуники и, в большей степени, Авачи, протекающих по территориям, охваченных хозяйственной деятельностью. Высокая численность деструкторов дизельного топлива, нефти и мазута указывает на хроническое загрязнение нефтепродуктами (Димитрисва, 1999 а), распад которых также формирует повышенное содержание в морской воде фенола.

Результаты микробной индикации подтвердили, что прибрежные воды г. Холмска испытывают влияние Цусимского течения, которое приносит с юга, от

Таблица 1

Абсолютная численность гетеротрофных колониеобразующих и фенолоксиляющих микроорганизмов (10^3 клеток/мл) в прибрежных водах дальневосточных морей

Район исследования	Авачинская губа (Камчатка, 1999г.)	Сахалин					Северное Приморье	Южное Приморье	
		г.Холмск, 1995,1997г.		зал.Чаيفо, 1998 г.	зал.Набия, 1998 г.	Ныйский зал., 1998 г.	б. Рудная 1997 г.	с. Большой Пелис	Амурский залив: заводы, бытовые стоки
Станция		ЦБЗ	ЖБФ						
Группа бактерий									
Гетеротрофы	218 ± 40	10 ± 2	30 ± 2	2870 ± 200	8670 ± 70	249 ± 18	2 ± 0,24	-	-
Деструкторы фенола	4,49 ± 1,45	2 ± 0	0,7 ± 0,08	9,6 ± 0,47	7,11 ± 0,2	5,85 ± 0,21	0	0	3 ± 0,25

Примечание: ЦБЗ – целлюлозно-бумажный завод; ЖБФ – жестяно-баночная фабрика;

(-) – исследования не проводились

западных берегов Японии различные загрязняющие вещества, в том числе и фенолы (Христофорова, 1985; Отчет лаб. экологии СахНИРО, 1992).

На Сахалине находятся 7 целлюлозно-бумажных заводов. В настоящее время действующим остался только один, находящийся на юго-западе острова. Однако после многолетней работы остальных шести предприятий, долгое время сбрасывающих неочищенные сточные воды в море, в прибрежных водах до сих пор находится большое количество разлагающейся щепы, о чем свидетельствует высокая численность фенолоксилирующих бактерий (табл. 1).

В заливах Набиль, Чайво и Ныйском, являющихся наиболее важными районами для экономики острова, также обнаружен высокий процент фенолоксилирующих бактерий (табл. 1). Однако причины загрязнения, вероятно, другие. Заливы являются районами нефтедобычи и, очевидно, фенольное загрязнение – результат окисления нефтяных углеводородов. Также имеются сведения, что северо-восток Сахалина находится под влиянием р. Амур, воды которого сильно загрязнены фенолами (Воронов, 2000).

Из 13 морей, омывающих берега России, Японское море наиболее подвержено антропогенной нагрузке (Государственный доклад..., 1998). Амурский залив является одним из самых загрязненных районов зал. Петра Великого в Японском море. Повышенное содержание фенолеструктуров нами регистрировалось в местах локализации источников фенольного загрязнения (табл.2). Во всех случаях доминирующие факторы разные, хотя, очевидно, что они не единственные: это и результат деструкции нефтяных загрязнений, и влияние сточных вод предприятий деревообрабатывающего комплекса, фекальных стеролов и угольных фенолов.

Содержание фенолов, регистрируемых в воде в районе фанерного завода по данным ОГСНК (общегосударственная служба наблюдения и контроля за загрязнением природной среды) в разные сроки, могло составлять 2-6 ПДК, на середине залива – 4-10 ПДК, в районе Второй Речки, содержащей промышленные и хозяйственно-бытовые стоки – 11 ПДК и выше.

Таким образом, сравнивая данные микробной индикации и химического анализа, мы видим, что каждому концентрационному диапазону фенола соответствуют определенные микробные индексы, которые объективно отражают уровень загрязнения моря этим поллютантом.

Таблица 2

Абсолютная численность фенолоксиляющих микроорганизмов (клеток / мл) в загрязненных участках прибрежных вод Амурского залива (1995–1996 гг.)

№ п/п	Станции	Наличие источников загрязнения	Фенолдес- трукторы
1.	Середина залива	Крупнотоннажный и маломерный флот	10^2
2.	Зал. Угловой	Угледобыча и фекальные стоки	10^3
3.	Ст. Садгород	Курортная зона, бытовые стоки	$4 \cdot 10$
4.	Б. Бражникова	Фанерный завод, промышленные стоки	$8 \cdot 10$
5.	Ст. Санаторная	Зона отдыха, городской пляж	$3 \cdot 10$
6.	Вторая Речка	Мебельная фабрика, крупный больничный и жилой комплексы	10^3
7.	Б. Федорова	Завод «Металлист», городской коллек- тор, гостиница, городской пляж	10^3

На основании химических данных по содержанию фенола и численности фенолрезистентных бактерий в морской воде обследованных районов определены примерные критерии загрязнения акватории фенолами по микробным показателям (табл. 3). Эти критерии были апробированы и уточнены в течении двух лет в рамках проекта «Тумангаи» при исследовании влияния р. Туманной, несущей свои воды с территории промышленно развитых районов Китая и Северной Корси, в юго-западную часть зал. Петра Великого и, в частности, на акваторию Государственного морского заповедника. В результате исследований выявлено значительное загрязнение фенолами, которое может быть следствием как опосредованного (нефтяного) загрязнения, так и прямого (фекальные стеролы, пестициды и хлорированные фенолы). В

настоящее время эти результаты подтверждены данными химических анализов (Комплексная оценка..., 1996, 1997).

Таблица 3

Примерные критерии загрязненности морских вод фенолами на основе микробиологических показателей в абсолютных значениях (кл./мл) (по Dimitricva, 1999)

Группа бактерий	Категории загрязненности				
	Чисто (фон) < ПДК	Небольшое превышение фона (\cong ПДК)	Ощутимое (> 1-3 ПДК)	Значительное (сильное) (> 3 ПДК)	Очень сильное (>10 ПДК)
Фекопостроукторы	0	1 – 10	$< 10^2$	$< 10^3$	$\geq 10^3$
Символ	0	*	□	▼	■

ПДК – предельно допустимая концентрация для рыбохозяйственных водоемов (по Перечень..., 1995).

Наиболее благоприятной по фенольному загрязнению на общем фоне выглядит обстановка на севере Приморья. На всех обследованных станциях бухты Рудной фенолоксиляющая микрофлора не была обнаружена (табл.2), что свидетельствует о чистоте района относительно данного поллютанта.

Таким образом, исходя из данных литературы, химических анализов и полученных результатов, мы имеем некоторые доказательства, подтверждающие реальность индивидуального отклика микробов на содержание фенолов в различных концентрациях в прибрежных водах дальневосточных морей.

4. РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЭКОЛОГИЧЕСКОМ РАВНОВЕСИИ МОРСКИХ ПРИБРЕЖНЫХ ЭКОСИСТЕМ

4.1. Анализ состава микробных сообществ морской среды, выделенных из разных районов акватории Амурского залива

Проблема распада сложных органических соединений является одной из важнейших в микробиологии (Одум, 1975). Чем больше ксенобиотик отличается

от природных субстратов, тем меньше вероятность широкого распространения штаммов, способных к его утилизации. Лишь там, где имеет место длительный контакт микроорганизмов, обладающих высокой гибкостью метаболических реакций с соответствующим веществом, возможно формирование штаммов-деструкторов. Такими объектами являются сточные воды, активные илы очистных сооружений, а также места, находящиеся под влиянием сточных вод специализированных предприятий. Осповываясь на этом, районом исследования мы выбрали участок акватории Амурского залива, находящийся в непосредственной близости с фанерным заводом, сточные воды которого содержат фенольные соединения. Были исследованы 3 станции, две из которых находились под влиянием стоков фанзавода, третья – контрольная (рис.2).

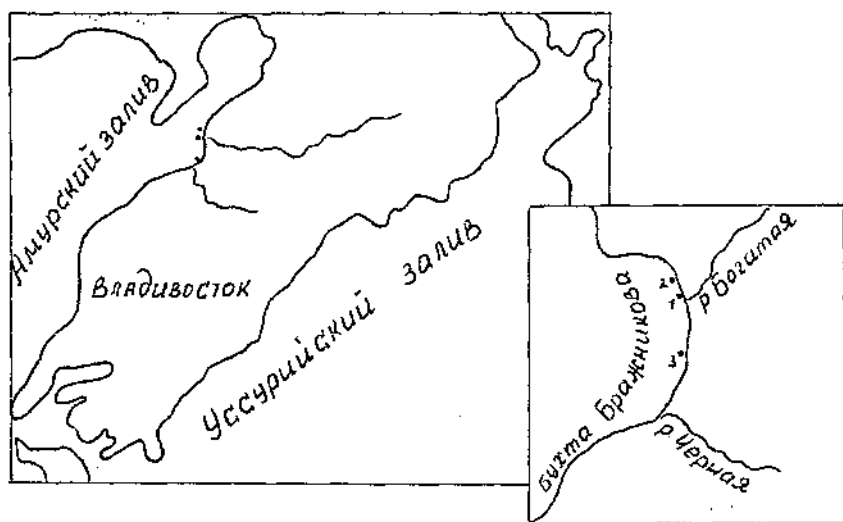


Рис. 2. Схема расположения станций отбора проб в б. Бражникова (Амурский залив)

Среди бактерий, выделенных из первых двух станций, обнаружены представители родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Planococcus*, а также группа коринеформных бактерий. Среди них преобладали бациллы, псевдомонады и микрококки, являющиеся известными

фенолдеструкторами в природе и очистных сооружениях. Состав микробного сообщества контрольной станции заметно отличался. Помимо псевдомонад здесь доминировали бактерии семейств Vibrionaceae (Aeromonas) и Enterobacteriaceae, также встречались коринеформные бактерии, кокковая форма отсутствовала. Следует отметить, что из проб, взятых на этой станции, фенолустойчивая микрофлора практически не была высеяна (табл. 4).

Таблица 4

Состав микробных сообществ загрязненного фенолом (А) и фонового (Б) участков акватории Амурского залива (июнь, 1993)

Род, группа бактерий	А (%)	Б (%)
Bacillus	28	15
Pseudomonas	19	30
Micrococcus	38	0
Staphylococcus	5	0
Planococcus	5	0
Aeromonas	0	37
Enterobacteriaceae	0	11
Коринеформные бактерии	5	7

Таким образом, результаты показывают, что в местах локализации специализированных предприятий происходит формирование специфической микрофлоры, устойчивой к фенолу, которая по составу сходна с микрофлорой активных илов очистных сооружений. Появление таких микробных биоценозов является важнейшим биологическим откликом на химическое загрязнение Мирового океана.

4.2. Особенности фенолдеструкции микроорганизмами, выделенными из природных морских сообществ залива Петра Великого

При исследовании морской воды и донных осадков были выделены 76 штамма, обладавших различной способностью роста на феноле. До 50 % исследованных штаммов были способны давать рост на средах с концентрацией фенола 0,5-2,5 %, такие растворы в практике используются в качестве

дезинфицирующих. Особенно активный рост по сравнению с другими исследованными бактериями был обнаружен у штамма *Bacillus pumilus* МММ 21 (Музей морских микроорганизмов ДВГУ), который давал рост в очень токсичных растворах фенола, например, при 0,5% концентрации фенола культура достигала концентрации 10^8 кл/мл при исходной – 10^5 кл/мл. Учитывая высокий потенциал этого штамма, был более детально исследован процесс обезвреживания им фенола в разных условиях, который проводили параллельно с изучением кинетики роста. Исследование кинетики роста культуры показало, что процесс подчинялся известным закономерностям и соответствовал классической кривой кинетики роста, когда наиболее активную логарифмическую фазу культура проходила в первые сутки (рис 3). При добавлении фенола все параметры культуры резко менялись и кривая роста приобретала затяжной характер с отсутствием четко выраженной лаг-фазы и стационарной фазы (рис.3, II б). Различия проявлялись в зависимости от сред. МВ и ЭС были довольно близки по эффекту, хотя на МВ культура быстрее достигает максимума (рис.3, II а, б). ИМВ, не содержащая других органических соединений, кроме фенола, была явно неблагоприятной. Эти данные подтверждают известный факт, что для большинства бактерий деструкция фенола эффективнее идет в присутствии ко-деструктора, в качестве которого выступают небольшие концентрации органических веществ (Шлггель, 1987).

Биодеградация токсиканта не всегда совпадает по времени с обезвреживанием среды, так как последняя часто содержит токсичные продукты его деструкции. Поэтому более важной по биологическому эффекту является оценка не деструкции, а детоксикации полиптантов. В связи с этим мы изучили скорость детоксикации фенолсодержащей жидкости бактериальной культурой. Процесс детоксикации протекает несколько быстрее на среде ЭС, чем на МВ (рис.3, I). С понижением температуры детоксикация ускоряется, и различие между средами становится более очевидным. Так, при 32°C в обоих случаях детоксикация заканчивается через 14 дней, при 20°C и 2°C - соответственно через 12 и 9 дней. Вероятно, это связано с образованием

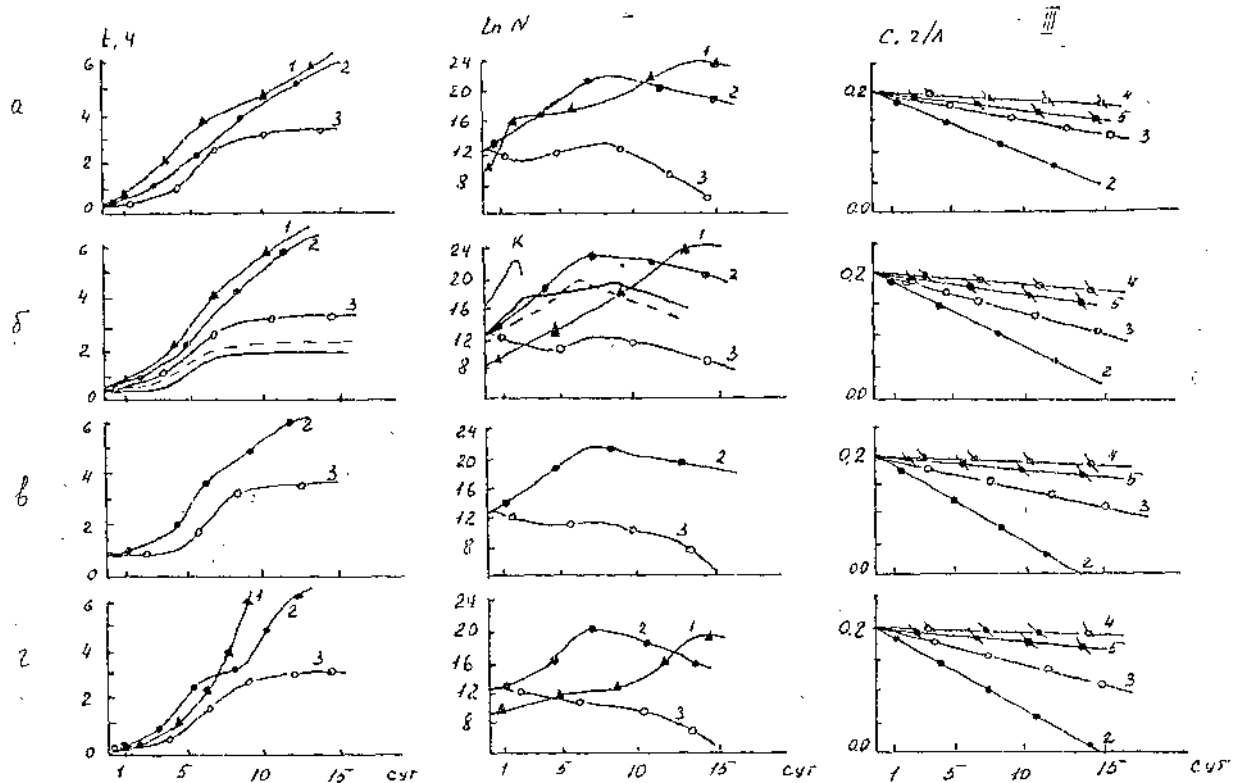


Рис. 3. Влияние состава среды, температуры и концентрации на детоксикацию (I), рост (II) и биодеградацию фенола (III) культурой *Bacillus pumilus* (исходная концентрация фенола в среде 1 г/л): - - - 10 г/л, — 25 г/л; 1 - среда ЭС, 2 - МВ, 3 - НМВ; среды того же состава, но без бактерий: 4 - НМВ, 5 - МВ; К - контроль среды СММ с бактериями без фенола; а - 32°C, б - 20°C, в - 10°C, г - 2°C; 1 - время жизни клеток тест-организмов; N - число живых клеток

меньшего количества токсичных микробных метаболитов, хотя говорить о причинах усиления различий между средами невозможно, так как состав конкретной морской воды точно не известен. Быстрее всего детоксикация завершается на среде ЭС при 2°C. Это указывает на явные психрофильные свойства бактерии.

Несмотря на нюансы можно однозначно сказать, что процесс детоксикации находится в прямой зависимости от роста культуры. Как правило он заканчивается после экспоненциальной фазы. Исключением является ИМБ. На этой среде процесс детоксикации продолжается только до категории "токсично". Остановка процесса совпадает по времени с резким снижением численности бактерий. Высокоэффективная газожидкостная хроматография показала, что к окончанию времени детоксикации фенол в среде исчезает (рис. 4).

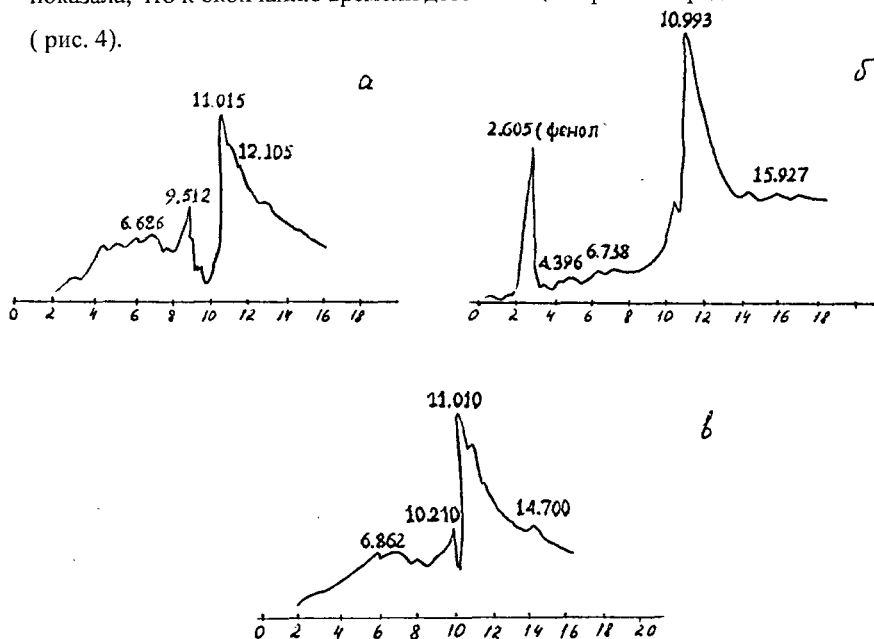


Рис. 4. Хроматограмма среды ЭС (а); культуральной среды ЭС с фенолом (0,5 г/л), не содержащей бактерий (б); в присутствии штамма *Bacillus pumilus*: MMM 21 после 10 - суточной экспозиции (в) при 32°C

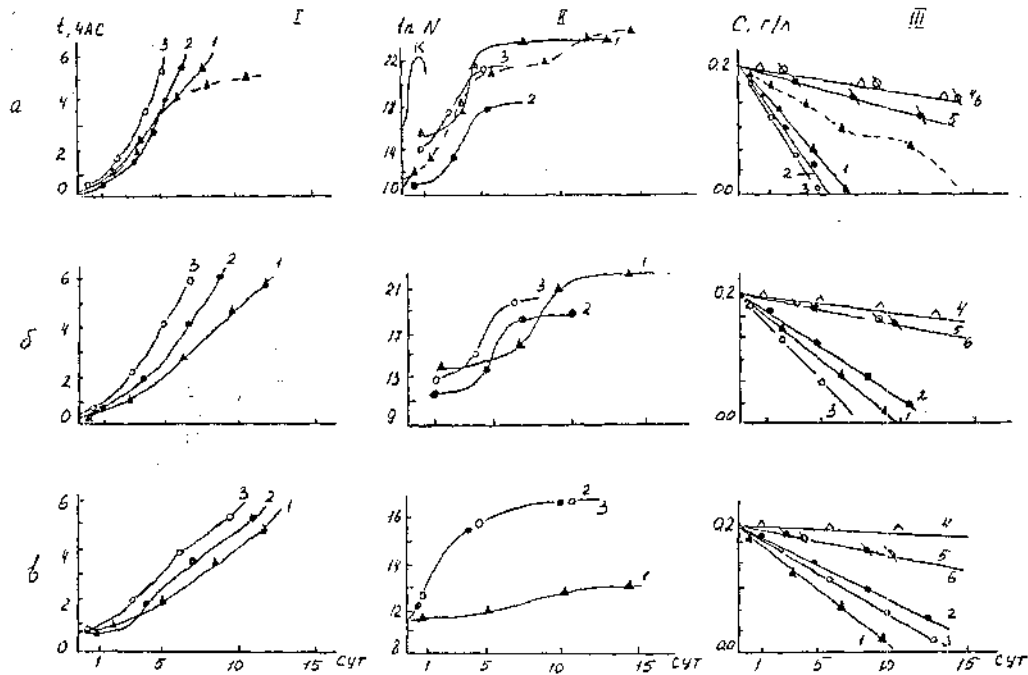


Рис. 5. Влияние состава среды и температуры на детоксикацию фенола (I), кинетику роста в присутствии фенола (II), деструкцию фенола (1 г/л) (III) культурой эпифитной псевдоальтеромонады МММ 18: а - $-32^{\circ}C$, б - $-20^{\circ}C$, в - $-10^{\circ}C$; 1 - среда ЭС, 2 - МВ, 3 - ИМВ; среды того же состава, но без бактерий: 4 - ЭС, 5 - МВ, 6 - ИМВ; --- - первый тип; — — УФ-мутант; К - контроль (кривая роста культуры без фенола на среде для морских микроорганизмов (СММ)); t - время жизни клеток тест-организмов; N - число живых клеток

Несколько иные результаты дало изучение эпифитной псевдоальтеромонадоподобной бактерии МММ 18, выделенной с поверхности ламинариевых водорослей. Изучение этого штамма показало, что некоторые общие закономерности обезвреживания фенола были сходны с таковыми, обнаруженными у *V. rishii* МММ 21. Например, наиболее активно процесс детоксикации также проходил в экспоненциальной фазе, хотя завершался в фазу замедленного роста и примерно в те же сроки. Однако, выявились и различия (рис.5). Так, видно, что хотя на среде ЭС культура накапливает большую биомассу, процесс детоксикации быстрее всего заканчивается на искусственной морской воде, где фенол является единственным источником углерода. Следовательно, в отличие от бактерий, эпифитные псевдоальтеромонады не нуждаются в ко-субстрате.

Методом УФ-мутационеза и последующей селекции культуры были отобраны экологически безопасные клоны, культура которых достигала конца экспоненциальной фазы в 3 раза быстрее, то есть к 5 суткам, стационарной фазы – к 7 суткам (рис. 5 II а). При этом время детоксикации сокращалось на 1/3 и к концу процесса почти до нуля падало содержание фенола.

Таким образом, в результате работы показан высокий самоочищающий потенциал морской прибрежной среды в отношении фенолов, обусловленный жизнедеятельностью микроорганизмов. При этом выявлен такой резервуар природных деструкторов фенола, как ламинариевые водоросли, которые могут быть использованы в санитарной марикультуре для защиты морской среды и ее восстановления при загрязнении фенолами.

ВЫВОДЫ

Выполненная нами работа после решения поставленных задач позволяет сделать следующие выводы:

1. С помощью методов микробной индикации подтверждено, что прибрежные воды Дальневосточного бассейна подвержены антропогенной нагрузке и в значительной мере загрязнены фенолами.

2. Показано, что численность фенолоксиляющих микроорганизмов объективно отражает содержание фенола в морской среде. Каждому концентрационному диапазону фенола соответствуют определенные микробные индексы.

3. Выяснено, что микробные сообщества фонового и загрязненных фенолами районов в значительной степени отличаются друг от друга. Микробные биоценозы, устойчивые к фенолу, по своему составу близки к микрофлоре активных илов очистных сооружений.

4. Обнаружено, что планктонные микроорганизмы, обитающие в прибрежной зоне районов, подверженных антропогенной нагрузке, хорошо адаптированы к условиям урбанизированной среды и эффективно разрушают фенолы в широком диапазоне концентраций, температур и сред, что обеспечивает высокие темпы самоочищения моря.

5. Выявлено, что эпифитная микрофлора ламинариевых водорослей обладает активным ферментативным комплексом, разрушающим фенол, который активизируется при УФ-облучении.

6. Установлено, что процесс деструкции фенола зависит от его концентрации, температуры, стадии роста культуры микроорганизмов, а у бактерий – также от присутствия в среде ко-субстрата.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Дмитриева Г.Ю., Христофорова Н.К., Дмитриев С.М., Шевченко И.С., Михайлов В.В., Дроздовская О.А., Черемисинова Т.Г., Фаворов В.Н. Возможность самоочищения прибрежных экосистем Японского моря от ионных загрязнений с помощью морских автохтонных микроорганизмов // Северная Пацифика: гидрометеорология, охрана окружающей среды, география: Тез. докл. междунар. конф. Владивосток, 1994. С. 30-31.

2. Дроздовская О.А., Черемисинова Т.Г., Тювелева Е.Е. Изучение и перспективы использования эпифитной микрофлоры ламинариевых водорослей санитарной марикультуре // Биоресурсы морских и пресноводных экосистем: тез. докл. конф. молодых ученых ТИНРО. Владивосток, 1995. С. 111-112.

3. Dimitrieva G. Yu., Khristoforova N.K., Dimitriev S.M., Drozdovskaya O.A., Tuveleva E.E., Cheremisina T.G., Moshkova Z.G. Features of detoxification of phenol by microorganisms in marine coastal environment // Asia-Pacific conf. on science & management of coastal environment. Hong Kong, 1996. P. 37.

4. Дроздовская О.А., Черемисинова Т.Г. Влияние реки Туманной на залив Петра Великого по данным микробиологического мониторинга // Биомониторинг и рациональное использование гидробионтов: Тез. докл. конф. молодых ученых ИИНРО. Владивосток, 1997. С. 105-106.

5. Дмитриева Г.Ю., Дроздовская О.А., Черемисинова Т.Г. Оценка влияния р. Туманной на качество водной среды Дальневосточного морского заповедника по данным усовершенствованного метода микробной индикации // Тез. докл. III Дальневосточной конф. по заповедному делу. Владивосток, 1997. С. 36.

6. Dimitrieva G. Yu., Dimitriev S.M., Drozdovskaya O.A., Tuveleva E.E., Tkachenko O.Y., Khristoforova N.K. Using Newly developed microbial methods for multi-factor fast estimation of quality of marine environment and its preservation from oil, phenol and biogenic pollution // Proc. Intern. Symp. on Preservation of the Environment of the Japan Sea. Kanazawa, 1997. P. 17-35.

7. Дмитриева Г.Ю., Христофорова Н.К., Дроздовская О.А., Тувслева Е.Е. Дмитриев С.М., Шевченко Л.С. Детоксикация фенола микроорганизмами прибрежной зоны моря // Микробиология. 1999. Т. 68. № 1. С. 107-113.

8. Дроздовская О.А. Перспективы использования микробной индикации для мониторинга содержания фенольных загрязнений в прибрежных морских водах // Тез. докл. IV Региональной конференции молодых ученых «Проблемы экологии и рационального природопользования Дальнего Востока. Владивосток, 2000. С. 99-100.