

На правах рукописи

**ВОРОБЬЕВА Таисия Яркиевна**

**ПРОСТРАНСТВЕННО – ВРЕМЕННАЯ СТРУКТУРА  
ГЕТЕРОТРОФНОГО БАКТЕРИОПЛАНКТОНА  
ЭКОСИСТЕМЫ УСТЬЕВОЙ ОБЛАСТИ  
РЕКИ СЕВЕРНАЯ ДВИНА**

03.00.16 – экология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Сыктывкар – 2005

Работа выполнена в лаборатории водных экосистем Института  
экологических проблем Севера  
Уральского отделения РАН Архангельского НЦ

Научный руководитель: доктор медицинских наук,  
профессор Добродеева Л.К.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,  
профессор Бебякова Н.А.  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Лешко Ю.В.

Ведущее учреждение: Институт водных проблем Севера Карельского НЦ  
РАН

Защита состоится «8 июня» 2005 г. в 14.30 часов на заседании  
диссертационного совета Д.004.07.01 в Институте биологии Коми НЦ УрО  
РАН по адресу: 167982, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28.

Факс дисс. совета: (8212) 24-01-63; e-mail: dissovet@ib.komisc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Коми НЦ УрО РАН  
по адресу: 167982, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 24.

Автореферат разослан «25» апреля 2005 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук



А.Г.Кудяшева

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Река Северная Двина является крупнейшей водно - транспортной системой Европейского Севера РФ. В бассейне реки располагаются предприятия лесопромышленного комплекса. Загрязнение поверхностных вод бассейна Северной Двины во многом обусловлено сбросом сточных вод целлюлозно - бумажных комбинатов (ЦБК), на долю смешанных сточных вод которых приходится 47% общего объема стоков в устьевую часть реки. Устьевая область реки подвержена техногенному воздействию, вследствие интегрирования загрязнения со всего бассейна реки и высокой концентрации населенных пунктов, и промышленных предприятий. При этом в исследуемом районе смешиваются и трансформируются две различные по генезису массы воды - речная и морская. В связи с этим увеличивается роль микробиоценоза, как наиболее лабильного сообщества, участвующего в поддержании гомеостаза. Микробные сообщества благодаря широкому диапазону адаптационных возможностей быстро реагируют на смену экологических условий. Ведущую роль в круговороте веществ играют гетеротрофные бактерии, основной функцией которых является деструкция органических веществ. Значительный вклад в процессы самоочищения вносят как автохтонная, так и аллохтонная части гетеротрофных бактерий.

Исследование роли аллохтонного бактериопланктона в формировании биоценоза и его влияние на процессы самоочищения представляется актуальным. Кроме того, увеличение численности определенных групп аллохтонных бактерий может нести эпидемиологическую опасность.

**Целью** настоящего исследования являлось изучение основных закономерностей распределения гетеротрофного бактериопланктона в устьевой области реки Северная Двина в зависимости от действия биотических и абиотических факторов среды.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить экологическую структуру гетеротрофных бактерий экосистемы устьевой области реки Северная Двина.
2. Изучить зависимость структуры и динамики микробиоценоза от состояния фито- и зоопланктона, а также химического состава воды.
3. Исследовать изменения структуры, концентрации аллохтонной и автохтонной микрофлоры в зависимости от антропогенной нагрузки, сезона и гидрологического режима реки.
4. Определить содержание энтеробактерий в водной экосистеме устья р. Северная Двина и их роль в процессах самоочищения.

**Научная новизна.** Впервые по микробиологическим показателям оценено состояние экосистемы устьевой части реки Северная Двина.

Установлено, что гетеротрофные бактерии являются активными участниками процессов деструкции органических веществ в устье реки Северная Двина.

Доказано, что увеличение времени выживания аллохтонных микроорганизмов меняют структуру гетеротрофного бактериопланктона с

увеличением доли семейства Enterobacteriaceae на значительном отрезке реки до зоны смешения речных и морских вод.

Установлено, что за последние 20 лет роль бактериопланктона в трофической цепи планктонных сообществ в устьевой области реки Северная Двина возросла в условиях повышенной антропогенной нагрузки.

Впервые выявлена способность бактерий семейства Enterobacteriaceae к деструкции нефти и нефтепродуктов.

**Практическая значимость.** Проведенная оценка экологической структуры микробиоценоза устьевой области реки Северная Двина может быть использована в качестве базовой информации для мониторинговых исследований состояния данной водной экосистемы. Выделенные углеводородокисляющие бактерии могут быть использованы для разработки биопрепаратов по биодegradации нефтепродуктов в водных экосистемах и рекультивации почвы северных регионов. Материалы диссертационной работы полезны для курса лекций по специальностям: экология, гидробиология, эпидемиология, микробиология и биотехнология.

**Достоверность результатов.** Достоверность научных положений и выводов обеспечивается обширным фактическим материалом 7 - летних экспедиционных работ, большим объемом обработанного материала (959 проб), применением современных методов исследования и математического анализа.

#### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Загрязнение водной экосистемы реки Северная Двина стоками ЦБК обуславливает увеличение концентрации гетеротрофного бактериопланктона и снижение численности фитопланктона.
2. Сезонные колебания содержания гетеротрофного бактериопланктона устья Северной Двины зависят от температурного режима, уровней биогенных элементов и биотических взаимосвязей компонентов трофической цепи.
3. Высокий уровень загрязнения устьевой области реки бактериями группы кишечных палочек объясняется присутствием больших количеств этих бактерий в промышленных и терригенных стоках, а также их способностью к длительному выживанию в воде.
4. Энтеробактерии вида *Klebsiella planticola*, *Enterobacter dissolvens*, *Escherichia coli*, выделенные из вод реки Северная Двина, являются активными деструкторами нефтепродуктов.

**Личный вклад автора.** Отбор проб воды проводился непосредственно автором исследования в период экспедиционных работ. Бактериологические исследования в преобладающем большинстве проведены автором. Автором проведен комплекс экспериментальных исследований: определение фосфатаккумулялирующих микроорганизмов, выделение и идентификация углеводородокисляющих, сульфитредуцирующих бактерий, энтеробактерий; поставлены опыты по выживаемости в речной воде и способности к деградации нефтепродуктов бактериями семейства Enterobacteriaceae. Автором выполнена статистическая

обработка, анализ и обобщение полученных результатов.

**Апробация работы.** Результаты исследований были доложены и обсуждены на научных конференциях: Международной конференции молодых ученых и специалистов «Экология-98», (Архангельск, 1998), Международной конференции «Геодинамика и геоэкология», (Архангельск, 1999), Международной конференции «Поморье в Баренц-регионе на рубеже веков: Экология, экономика, культура» (Архангельск, 2000); Международной конференции «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера» (Сыктывкар, 2003); Всероссийской конференции «Стратегия развития северных регионов России» (Архангельск, 2003), Всероссийской конференции с международным участием «Биологические аспекты экологии человека» (Архангельск, 2004).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 10 работ.

**Структура диссертации.** Работа изложена на 165 страницах машинописного текста и состоит из введения, шести глав, списка литературы и приложений. Список литературы содержит 218 наименований, в том числе 34 на иностранных языках. Иллюстративный материал включает 23 рисунка и 28 таблиц.

**Благодарности:** Автор выражает глубокую благодарность д.м.н., профессору Л.К. Добродеевой за общее руководство исследований, сотрудникам лаборатории водных экосистем ИЭПС УрО РАН и бактериологической лаборатории СМЦ им. Н.А.Семашко г. Архангельска за неоценимую помощь в процессе сбора и обработки материала. Особая благодарность д.б.н Саралову А.И., д.б.н Ильинскому В.В., к.т.н. Селяниной С.Б., к.б.н. Прожериной Н.А. за консультации.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Гетеротрофный бактериопланктон в водных экосистемах

В обзоре литературы дан анализ сведений о распространении, сроках выживания и участия в круговороте веществ гетеротрофного бактериопланктона в водных экосистемах. Проанализирована роль гетеротрофных бактерий, как неотъемлемой части водных экосистем, и их активности в процессах самоочищения гидросферы от широкого спектра загрязняющих веществ, в число которых входят и нефтяные углеводороды.

### Глава 2. Физико – географическая, гидрологическая и гидрохимическая характеристика реки Северная Двина

Северная Двина – одна из крупнейших рек европейского Севера. Река образуется от слияния рек Сухона и Юга, течет в северо - западном направлении и впадает в Двинскую губу Белого моря.

Устьевая область Северной Двины охватывает обширный участок нижнего течения реки от впадения Пинеги до морского края дельты и юго-восточную часть Двинского залива Белого моря. Ниже г. Архангельска Северная Двина формирует треугольную дельту с пятью крупными рукавами - Никольским, Мурманским, Корабельным, Маймаксой и Кузнечихой, на долю которых приходится соответственно 32.2, 18.2, 21.5, 18.4, 5.4%

суммарного стока реки в вершине дельты (Михайлов, 1998).

Сложные гидрологический и гидрохимический режимы этой области обусловлены взаимодействием речных и морских вод. Химический состав устьевой области реки формируется под воздействием, как физико-географических, так и хозяйственной деятельности человека. Антропогенное влияние в отдельных районах является доминирующим фактором. Высокая внутри- и межгодовая изменчивость гидрохимического режима в нижнем течении реки и заметное повышение «антропогенно - измененного» фона по целому ряду приоритетных загрязняющих веществ обуславливается техногенным воздействием (Брызгалю, Иванов, 2002; Доброскок, 2002). Вследствие спорадических сбросов сточных вод нарушается естественный ритм сезонной динамики биогенных элементов. Увеличение концентрации не всегда связано с фазами внутри годового цикла и может происходить бессистемно в любом месяце (Брызгалю, Иванов, 2002).

### Глава 3. Материал и методика исследований

Объектом изучения является речная вода устьевой области реки Северная Двина, а также очищенные и неочищенные смешанные сточные воды (СВ) Архангельского и Соломбальского ЦБК. Исследовано 959 проб речной воды и сточных вод в период с 1978 по 2003 гг. Схема расположения станций представлена на рис. 1.

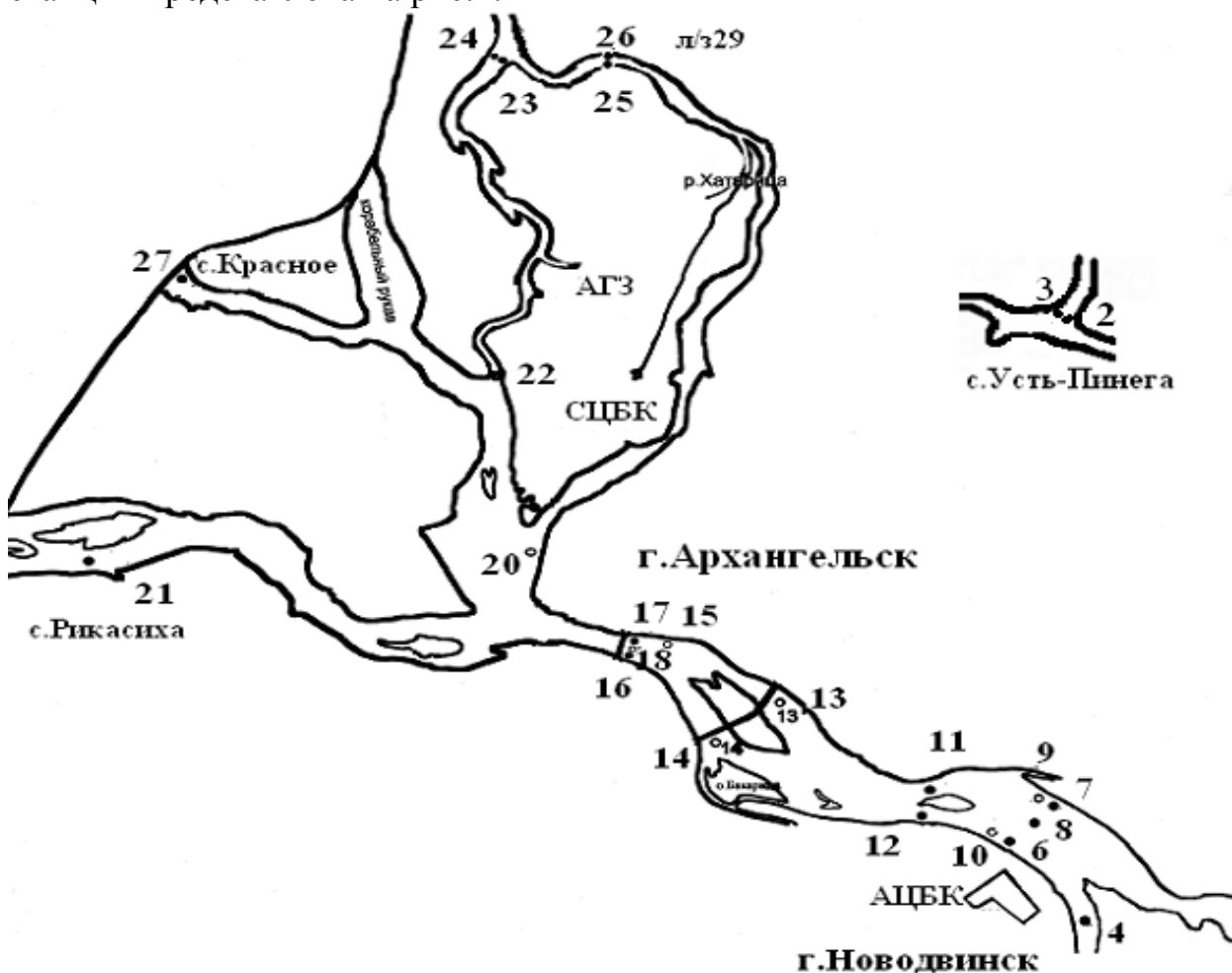


Рис. 1. Схема расположения станций отбора проб воды; 4-27 номера станций, ● и ○ - постоянные и разовые станции соответственно

Отбор проб речной воды проводили в зависимости от гидрологического режима (на малой воде) и сезонного фактора.

Отбор проб воды, гидробиологические и микробиологические исследования производили стандартными методами (Родина, 1965; Кузнецов, Дубинина, 1989; Абакумов, 1992; Методическое..., 2000). Определение общей численности ( $N_6$ ), биомассы ( $B_6$ ) и размеров клеток вели по общепринятым методикам (Кузнецов, Дубинина, 1989). Количество клеток фосфатаккумулялирующих бактерий (с гранулами волютина,  $N_v$ ) подсчитывали на мембранных фильтрах «Sartorius» с диаметром пор 0.2 мкм, прокрашенных в течение 1.5 суток толуидиновым синим (Методы общей бактериологии, 1983).

Культивирование гетеротрофных микроорганизмов для изучения их экологической структуры проводили на средах: сухой питательный агар (СПА) для эвтрофов при температурном режиме +20 и +37°C; Горбенко (СПА:10) для факультативно олиготрофных бактерий при температурном режиме +20°C. Для определения бактерий группы кишечных палочек использовали среды «Эндо», «МакКонки», «Левина», «Сальмонелла-шигелла», цитратный агар Симонсона. Для выделения фекальных кишечных палочек (ФКП) применяли желчно-лактозный бульон с бриллиантовым зеленым и лактозный бульон с борной кислотой. При определении бактерий группы кишечных палочек до видовой принадлежности исследования проводили по биохимическим параметрам тест-системы «ENTERO - Rapid 24». Для разделения условно-патогенных и сапротрофных бактерий рода *Klebsiella* была использована среда «Клебиселла-5АСК», для выделения сульфитредуцирующих анаэробных бактерий рода *Clostridium* применяли железо - сульфитную среду Вильсона-Блера при температуре инкубации +43 - +44.5°C. Численность углеводородокисляющих бактерий определяли методом предельных разведений на жидкой питательной среде Диановой – Ворошиловой.

Биологическое разнообразие сообществ оценивали, с помощью индексов разнообразия и выравненности Шеннона (Одум, 1986; Мэггаран, 1992).

Статистическую обработку, построение графиков и диаграмм вели с применением пакета программ Excel'97. Для проведения регрессионного анализа использована программа Curve Expert 1.3. Дисперсионный однофакторный анализ проведен с помощью программы SPSS 11.0. Кластерный анализ данных осуществляли с помощью программы Statistica 5.0 (Дэвис, 1990; Боровиков, Боровиков, 1998).

#### **Глава 4. Влияние экологических факторов на структуру и количественные показатели гетеротрофного бактериопланктона устьевой области реки Северная Двина**

Высокая антропогенная нагрузка, которую в течение многих десятилетий испытывают водные экосистемы в бассейне Северной Двины, в том числе ее устьевая область, привела к ухудшению количественных и качественных характеристик биоценозов. Однако эти изменения не всегда

проявляются в явно выраженной форме (например, в зоне действия точечного источника загрязнения), и в целом о них можно говорить только в достаточно большом временном аспекте. Анализ литературных данных (Киселев, 1925; Величковский, 1927; Брызгалов, Неверова, 1984; Золотарева, 1988; Бреховских и др., 2003 и др.) и результатов собственных исследований показал, что состав планктонных сообществ за последние сто лет претерпел изменения, обусловленные ростом антропогенной нагрузки и уровня загрязнения водной среды. Основные изменения произошли в фитопланктонном сообществе: если с 20 – х по 80 – е годы двадцатого столетия наблюдалось только уменьшение размеров клеток, особенно в полисапробных зонах (Бреховских и др., 2003 и др.), то с 80-х годов отмечено достоверное снижение их численности ( $F=17.58$ ,  $p<0.001$ ;  $\eta^2=0.47$ ). При этом за исследованные периоды в структуре зоопланктонных сообществ не было выявлено существенных различий. Учитывая уменьшение численности фитопланктона при одновременном сохранении уровня развития зоопланктона, можно говорить об увеличении роли бактериопланктона в трофической сети устьевой области реки Северная Двина на современном этапе. В зонах интенсивного техногенного воздействия, рацион зоопланктона может состоять по большей части из бактерий в результате значительного снижения численности фитопланктона на данных участках. Дополнительно, в летнюю межень создаются оптимальные условия (рН-8.1-8.3) для формирования агрегатов с большой численностью бактерий, более эффективно поглощаемых зоопланктоном. Следовательно, бактериопланктон играет немаловажную роль в продуктивности устьевой области реки Северная Двина.

Район с активной антропогенной нагрузкой (0.5 км ниже сброса сточных вод АЦБК) характеризуется нарушением естественных соотношений компонентов планктонных сообществ. Это выражается в смене доминирующих видов и изменении количественных соотношений отдельных компонентов биоценоза. Бактериопланктон в районе сброса сточных вод достигает максимального обилия и качественного разнообразия, доминирующими становятся палочковидные и извитые формы, увеличивается доля гетеротрофных бактерий. Фитопланктон характеризуется большей зависимостью от техногенного влияния, в зоне влияния сточных вод АЦБК (0.5 км ниже сброса СВ АЦБК) численность и видовое разнообразие уменьшается. Зоопланктон менее подвержен влиянию сточных вод АЦБК - уменьшение численности, биомассы и видового разнообразия отмечается не всегда. Кластерный анализ, проведенный на основе рассмотренных показателей гетеротрофного бактериопланктона, выявил наибольшее отличие этой зоны (ст.6) от остальных районов исследования (рис.2).

Район влияния сточных вод АЦБК представляет собой локальную зону, к которой относится узкая полоса вдоль левого берега реки Северная Двина. Район сброса сточных вод АЦБК (0.5-1 км ниже) характеризуется наибольшим дисбалансом всех исследованных компонентов планктонных



сообществ, однако уже через 4 км ниже по течению численность фито- и зоопланктона начинается восстанавливаться, а количество гетеротрофных бактерий уменьшается. Далее по течению реки, 18 км ниже сброса сточных вод, концентрации фито- и зоопланктона приближаются к фоновым значениям, при этом отмечаются структурные изменения. Численность гетеротрофных бактерий увеличивается по сравнению с биотопом, расположенным 4 км ниже сброса сточных вод АЦБК. По нашему мнению, основной причиной роста уровня гетеротрофов на данном участке является постепенная адаптация аллохтонной микрофлоры к условиям водной среды. Нарушенная структура естественного микробиоценоза в зоне интенсивного техногенного влияния остается измененной и по мере уменьшения антропогенного пресса в устьевой области реки Северная Двина. Это подтверждается увеличением доли бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и рода *Clostridium* в гетеротрофном бактериопланктоне; по сравнению с фоновым биотопом в общей численности уменьшается доля кокковых форм с 71-90% до 56-80% в районе города.

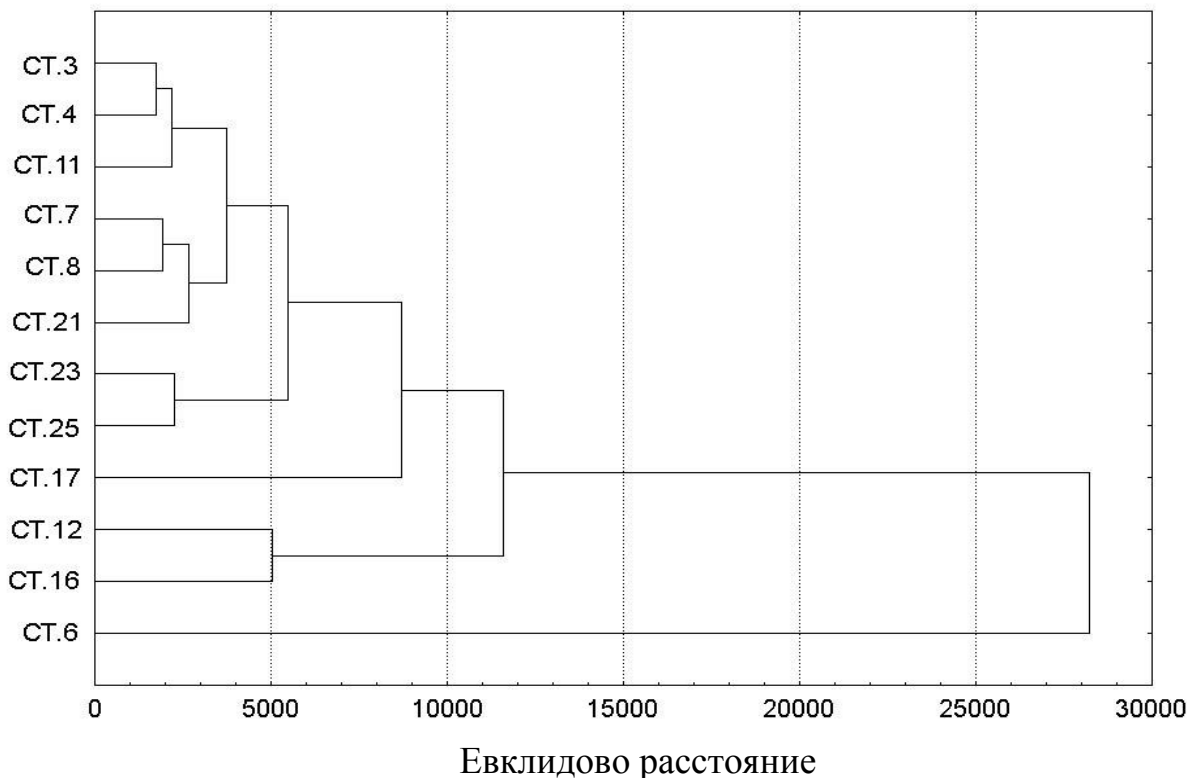


Рис.2. Кластерный анализ пространственной неоднородности гетеротрофного бактериопланктона в районе исследований (номера станций – см. рис.1)

Нами проведена оценка состояния экосистемы устья реки Северная Двина с помощью метода экологических модификаций (Абакумов, 1992). Изучение состояния планктонных сообществ устьевой области реки Северная Двина по показателям общей численности бактериопланктона ( $N_6$ ), числа сапрофитов, растущих при температуре 20°C (СБ) и их соотношений, а также численности фитопланктона (ФП) позволило сделать следующий вывод:

места интенсивного загрязнения имеют элементы экологического регресса, а в целом устьевая область реки находится в состоянии экологического напряжения (табл.1). На элементы экологического регресса указывают следующие факты: уменьшение численности фитопланктона; увеличение доли сапрофитов в общей численности бактериопланктона, низкие значения соотношений (100 и менее) общей численности микроорганизмов к содержанию гетеротрофных бактерий.

Изученная экологическая структура по карбофильности показала, что бактериоценоз характеризуется преобладанием факультативно олиготрофных бактерий (ФОБ) на фоновых станциях и уровень соотношения факультативных олиготрофов к эвтрофным (ЭБ) находится в диапазоне 3.2-10.1 не зависимо от сезона. В биотопах, подверженных интенсивному техногенному влиянию и в зоне смешения морских и речных вод, соотношения факультативно олиготрофных и эвтрофных бактерий уменьшаются (0.64-4.33). В зоне влияния сточных вод АЦБК (0.5 и 4 км ниже сброса) данные соотношения находились в пределах 1.43-3.55 и 2.55-4.33 соответственно. Остальные станции характеризовались низкими значениями соотношения факультативно - олиготрофных и эвтрофных бактерий в зимнюю и летнюю межени 0.64-1.22, с некоторым увеличением в осенний период исследований 1.17-2.40. В зоне влияния сточных вод СЦБК (на очистных сооружениях которого подвергаются очистке не только технические, но и муниципальные стоки) уровень соотношений ФОБ/ЭБ находится в диапазоне 0.97 - 1.31, уменьшаясь от зимней межени к осени. Низкие значения соотношений могут указывать с одной стороны об эвтрофировании исследуемой экосистемы. Н.А. Гавришовой (1986) и Г.Л. Марголиной (1989) показано, что для чистых вод характерно соотношение эвтрофов к факультативным олиготрофам равное 4 и выше. А в загрязненных и высокотрофных водах количество бактерий, вырастающих на обедненной среде, лишь в 2-3 раза превышает их число на СПА, и часто эти показатели сближаются. С другой стороны, довольно высокие значения численности как эвтрофов, так и олиготрофов в устьевой области реки Северной Двины могут свидетельствовать об активно протекающих процессах деструкции органического вещества с участием различных эколого-трофических групп микроорганизмов.

Низкие значения соотношений ФОБ/ЭБ могут свидетельствовать также об эвригетеротрофности части гетеротрофного бактериопланктона (т.е. способности к росту, как на бедных, так и на богатых органических средах). Способность к эвригетеротрофности бактериопланктона по мнению В.В. Ильинского (1995, 2000), может подтверждаться обнаружением прямых значимых корреляционных связей между численностью эвтрофных и олиготрофных бактерий. Линейные зависимости прослеживаются для исследуемой экосистемы устья Северной Двины: между эвтрофными и факультативно олиготрофными бактериями ( $r=0.827$   $p<0.001$ ); между олиготрофами и факультативными олиготрофами ( $r=0.919$   $p<0.001$ ); между олиготрофными и эвтрофными бактериями ( $r=0.724$   $p<0.01$ ).

Таблица 1

Диапазоны колебания численности бактерио- и фитопланктона в устье Северной Двины и классификация по эффекту антропогенного воздействия за период с 1997 г по 2002 г

Станции отбора проб	СБ, тыс.КОЕ/мл	N <sub>6</sub> , млн. кл/мл	N <sub>6</sub> /СБ	Диапазон колебания численности ФП, тыс.кл/мл		Частота встречаемости НЧВ диапазона, %	Статистические характеристики численности ФП		Эффект антропогенного воздействия
				Общий	НЧВ		M <sub>0</sub> ** тыс.кл/мл	P <sub>0</sub> ***	
4	<u>0.09-2.12*</u> 0.59±0.09	<u>0.35-3.67</u> 1.70±0.19	<u>497-19316</u> 6121±1123	<u>1.6-14.6</u> 8.2	11.4-14.6	43	12.7	33	Антропогенное эвтрофирование
6	<u>1.28-69.50</u> 23.22±3.19	<u>0.54-3.87</u> 2.18±0.14	<u>23-3023</u> 478±151	<u>1.2-8.0</u> 4.1	1.2-2.0	43	1.8	54	Элементы экологического регресса
12	<u>0.8-15.20</u> 5.50±0.64	<u>0.37-5.04</u> 2.24±0.36	<u>59-6300</u> 1121±422	–	–	–	–	–	Элементы экологического регресса
16	<u>0.27-24.20</u> 8.67±0.82	<u>0.79-5.09</u> 2.35±0.17	<u>123-13740</u> 1443±675	<u>1.2-11.4</u> 6.1	7.2-8.2	45	7.7	45	Антропогенное напряжение
17	<u>0.26-8.64</u> 2.52±0.36	<u>0.51-2.34</u> 1.59±0.11	<u>76-8538</u> 2463±547	<u>0.8-11.4</u> 4.5	4.0-5.2	36	4.3	30	Антропогенное напряжение
23	<u>0.84-16.60</u> 4.15±0.61	<u>0.77-3.06</u> 2.09±0.15	<u>165-2438</u> 803±294	<u>1.8-12.0</u> 7.2	9.0-9.6	33	9.3	55	Антропогенное напряжение
25	<u>0.20-34.20</u> 4.44±1.13	<u>1.07-3.44</u> 2.35±0.26	<u>105-1665</u> 829±182	<u>1.0-9.4</u> 4.3	1.0-2.0	50	1.4	83	Элементы экологического регресса

Примечание: \*- в числителе – минимальные и максимальные значения; в знаменателе – средние значения с ошибкой; \*\* - Мода внутри модального интервала (Венецкий, Венецкая, 1979); \*\*\*- плотность вариационного ряда; НЧВ – наиболее часто встречаемый диапазон численности.

Бактериопланктон, в том числе и его гетеротрофная составляющая, в устьевой области реки Северная Двина находится в тесной связи с абиотическими и биотическими факторами среды (рис.3, табл.2). Выявлена значимая положительная корреляционная связь общей численности бактериопланктона с количеством фитопланктона ( $r=0.536$ ;  $p<0.01$ ) и отрицательная с численностью зоопланктона ( $r=-0.594$ ;  $p<0.01$ ), что позволяет предположить наличие трофических взаимосвязей в исследуемой экосистеме. Высокие коэффициенты корреляций между численностью гетеротрофных бактерий с БПК<sub>5</sub> и содержанием аммонийного азота (NH<sub>4</sub>) указывают на то, что исследованные группы бактерий являются активными участниками процессов деструкции органических веществ в устье реки.

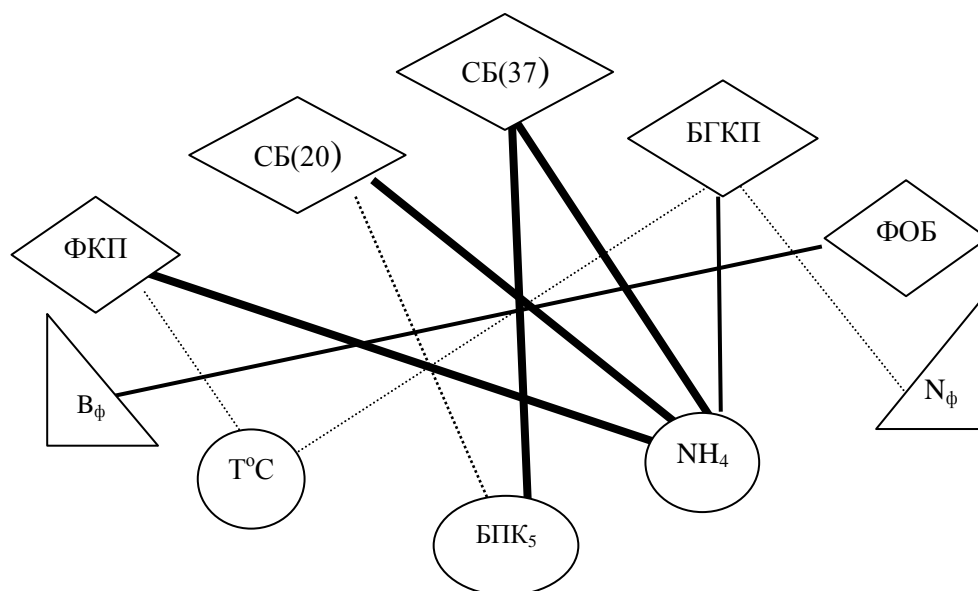


Рис.3. Корреляционные зависимости между численностью гетеротрофных бактерий и некоторыми экологическими факторами; «---» -  $p<0.05$ , « $\longleftrightarrow$ » -  $p<0.01$ , « $\longleftrightarrow$ » -  $p<0.001$ ; СБ (20), (37) – сапрофиты, растущие при 20 и 37 °С соответственно; БГКП – бактерии группы кишечных палочек (коли-индекс); ФКП – фекальные кишечные палочки; N<sub>φ</sub> и V<sub>φ</sub>- численность и биомасса фитопланктона; T<sup>°C</sup> – температура воды; БПК<sub>5</sub>-биохимическое потребление кислорода; NH<sub>4</sub>- аммонийный азот

Высокая активность сапрофитов-деструкторов отмечена для зимней межени, спада весеннего половодья и летних месяцев (табл.2). На спаде весеннего половодья и в летнюю межень происходит уменьшение индекса свежего фекального загрязнения (ФКП), связанное с повышением температуры и соответственно увеличением численности фитопланктонных организмов (в том числе синезеленых и зеленых водорослей), которые могут оказывать бактериостатические или бактерицидные действия (Зенова и др., 1995 и др.) на данную группу гетеротрофных бактерий. Осенью пробы воды отбирались в основном перед ледоставом при резком снижении температуры. О. Н. Труновой (1977) отмечено, что при низких значениях температуры у нативной микрофлоры происходит снижение биохимической

активности, а у бактерий семейства Enterobacteriaceae, наоборот, увеличиваются сроки выживания (Попович, Бондаренко, 1982; и др.) и даже происходит размножение (Бухарин, Литвин, 1997 и др.). Возможно, поэтому осенью выявлена обратная значимая связь между температурой воды и коли-индексом. На высокую адаптационную способность и активность бактерий группы кишечных палочек при низких температурах указывает значимая корреляционная связь с БПК<sub>5</sub> в данный период ( $p < 0.001$ ).

Таблица 2

Коэффициенты парной корреляции Пирсона между параметрами гетеротрофного бактериопланктона и некоторыми факторами среды в сезонном аспекте

Абиотические факторы	СБ(20)	СБ(37)	ФОБ	коли-индекс	Цитрат (+)	ФКП
Спад весеннего половодья, начало июня (n=25)						
Т °С воды	-0.208	0.022	-	<b>-0.556**</b>	-	-
БПК <sub>5</sub>	<b>0.681***</b>	<b>0.787***</b>	-	0.051	-	-
Нитритный азот	<b>0.531**</b>	<b>0.609**</b>	-	0.024	-	-
Общий фосфор	0.317	<b>0.521**</b>	-	-0.143	-	-
Летняя межень, август (n=26)						
Т °С воды	-0.189	-0.237	-0.382	-0.225	<b>-0.534**</b>	<b>-0.580**</b>
Аммонийный азот	<b>0.921***</b>	<b>0.814***</b>	<b>0.679***</b>	0.153	<b>0.764***</b>	<b>0.946***</b>
Общий азот	-0.146	-0.137	-	<b>0.892***</b>	<b>0.909***</b>	<b>0.937***</b>
Общий фосфор	-0.293	-0.398	-0.056	-0.129	-0.290	<b>-0.526**</b>
Кремний	-0.337	-0.129	-0.477	-0.399	-0.476	<b>-0.707***</b>
Осень, перед ледоставом, ноябрь (n=27)						
Т °С воды	-0.279	<b>0.457*</b>	0.276	<b>-0.400*</b>	-0.370	-0.359
БПК <sub>5</sub>	0.047	-0.152	-0.181	<b>0.921***</b>	<b>0.926***</b>	<b>0.918***</b>
O <sub>2</sub>	0.091	<b>-0.456*</b>	-0.351	0.195	0.194	0.133
Зимняя межень, начало марта (n=25)						
БПК <sub>5</sub>	0.253	<b>0.519**</b>	0.093	0.185	0.278	0.117
Аммонийный азот	<b>0.600**</b>	<b>0.678***</b>	0.328	<b>0.511**</b>	0.358	<b>0.563**</b>
Кремний	0.101	0.036	-0.002	-0.008	0.014	<b>-0.464*</b>

Примечание: \*, \*\*, \*\*\* значение достоверно при 0.05, 0.01 и 0.001 уровне значимости; n – число корреляционных пар, цитрат (+) – численность цитратположительных энтеробактерий; O<sub>2</sub> - растворенный кислород

Положительные взаимосвязи между численностью сапрофитов и количеством нитритного азота на спаде весеннего половодья могут свидетельствовать об участии гетеротрофных бактерий в процессах первого этапа нитрификации в изучаемой экосистеме. Об участии гетеротрофных бактерий в процессах минерализации органического азота в летнюю и зимнюю межени указывают высокие коэффициенты корреляции количества сапрофитов и концентрации аммонийного азота. Отсутствие значимых

коэффициентов корреляции между численностью сапрофитов и БПК<sub>5</sub>, а также с уровнем аммонийного азота перед ледоставом могут указывать на временное уменьшение активности данных микроорганизмов, что связано с перестройкой структуры экологических групп из-за резкого понижения температуры воды.

### Глава 5 – 6. Пространственно - временная изменчивость структуры гетеротрофного бактериопланктона устьевой области реки Северная Двина. Роль фосфатаккумулялирующих и углеводородокисляющих бактерий в процессах самоочищения экосистемы устьевой области реки Северная Двина

Результаты исследований показали, что независимо от сезона на фоновых станциях зафиксированы самые низкие количественные показатели всех исследованных групп гетеротрофных бактерий (рис.4).

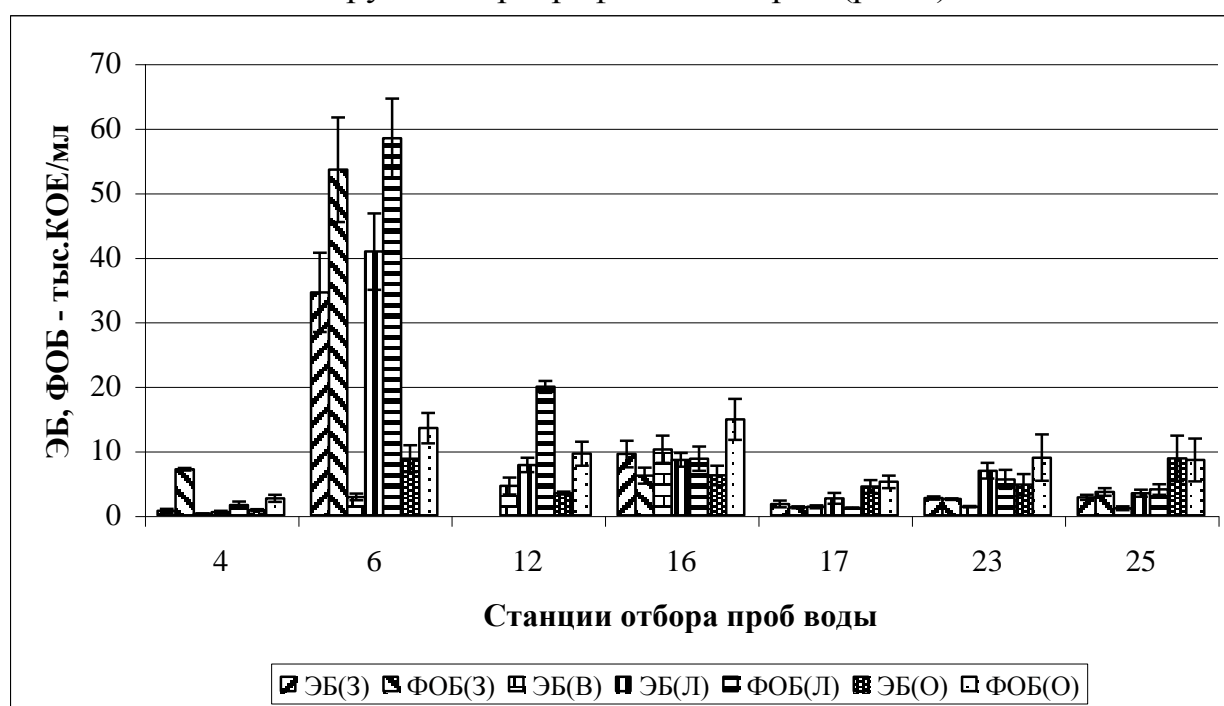


Рис. 4. Сезонная структура гетеротрофных бактерий (З, В, Л, О – зимнюю межень, на спаде весеннего половодья, в летнюю межень осенью, перед ледоставом соответственно)

Наиболее напряженная ситуация в биотопе с интенсивным техногенным загрязнением (ст.6) складывается в зимнюю и летнюю межени связанное, в основном, минимальными расходами воды. Для данных периодов отмечены наиболее высокие показатели численности гетеротрофного бактериопланктона в зоне сброса сточных вод. Ниже сброса сточных вод АЦБК по течению реки, вдоль левого берега, вне зависимости от сезона происходит постепенное снижение численности гетеротрофных бактерий к 4 и 10 км (ст.12 и 14), но к 18 км (ст. 16) отмечается увеличение исследованных показателей. Некоторое снижение количественных показателей в летнюю межень объясняется тем, что в устьевой области в это время происходит массовое развитие фитопланктона, который может

оказывать бактерицидное или бактериостатическое действие (Григорьева, 1975 и др.). Дополнительно в летнюю межень создаются оптимальные условия для развития фосфатаккумулялирующих бактерий, у которых в фазе накопления в клетках полифосфатов, снижается способность роста на богатых питательных средах (Саралов и др, 1999), обуславливая тем самым снижение их численности в данный период.

Фосфатаккумулялирующие бактерии являются составной частью сапрофитных бактерий. В летнюю межень наблюдаются высокие значения общей численности бактериопланктона с увеличением доли клеток с гранулами полифосфатов (14 - 44% от 3.65 - 4.38 млн. кл/мл), одновременно происходит увеличение объема клеток, а значит и биомассы бактериопланктона. По мнению А.И. Саралова с соавторами (1999) фосфатаккумулялирующие бактерии в щелочной среде способны к накоплению внутриклеточных фосфатов и фосфатов металлов на поверхности клеток и в среде. Следовательно, в летнюю межень в устье Северной Двины при значениях pH-8.1-8.4 фосфатаккумулялирующие бактерии активно участвуют в процессах самоочищения от загрязняющих веществ за счет агрегирования и осаждения в органо – минеральном комплексе.

Анализ сточных вод АЦБК и СЦБК показал, что в речные воды поступает значительное количество аллохтонной микрофлоры, в том числе бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и рода *Clostridium*. Но поступление бактерий неравномерно и их плотность в сточных водах меняется в широком диапазоне. Поэтому представленные на рис.5 средние значения численности исследованных групп гетеротрофных бактерий характеризуются высокими стандартными отклонениями. Наибольшее количество аллохтонной микрофлоры поступает со сточными водами условно-чистого выпуска АЦБК, в котором особенно велики значения индексов бактерий группы кишечных палочек и свежего фекального загрязнения с превышением санитарно-гигиенических норм до 800 раз (рис. 5). В результате район выпуска сточных вод и зоны влияния характеризуются превышением нормы от 1.5 до 56 раз. Данный факт можно объяснить тем, что сточные воды СЦБК и АЦБК проходят многоступенчатую очистку, а через условно – чистый выпуск АЦБК идут неочищенные стоки.

Места интенсивного загрязнения характеризуются расширенным спектром микробиоценоза с увеличением таксономического богатства представителей семейства *Enterobacteriaceae* с 1-2-х на фоновых станциях до 5-6 родов. Необходимо отметить, что на индекс таксономического разнообразия (индекс Шеннона) сезонный фактор практически не влиял, для фоновых станций индекс Шеннона был в диапазоне от 0 до 1 (среднее 0.51), индекс выравненности – от 0.41 до 0.99. Для станций, подверженных влиянию сточных вод ЦБК и ливневых городских стоков индекс биоразнообразия наиболее высокий – от 0.81 до 2.02, индекс выравненности от 0.24 до 0.99. На этих станциях редко проявляются явные доминирующие рода. Район города, где нормы содержания бактерий группы кишечных палочек превышены в 54 раза, отличается наличием ярко выраженной

доминанты (индекс выравненности от 0.16 до 0.58), которой является вид *Escherichia coli*. Сточные воды ЦБК имели индексы биоразнообразия в пределах 1.32 до 2.42, индекс выравненности 0.38-1. Для сточных вод характерно наиболее высокое видовое богатство. Выделены: *Klebsiella mobilis*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella ozaenae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter dissolvens*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Proteus sp.*, *Hafnia alvei*, *Serratia marcescens*, *Erwinia sp*, *Sallmonella sp*. Практически все эти бактерии были обнаружены в речной воде. Таксономическая представленность по биотопам приведена на рис. 6.

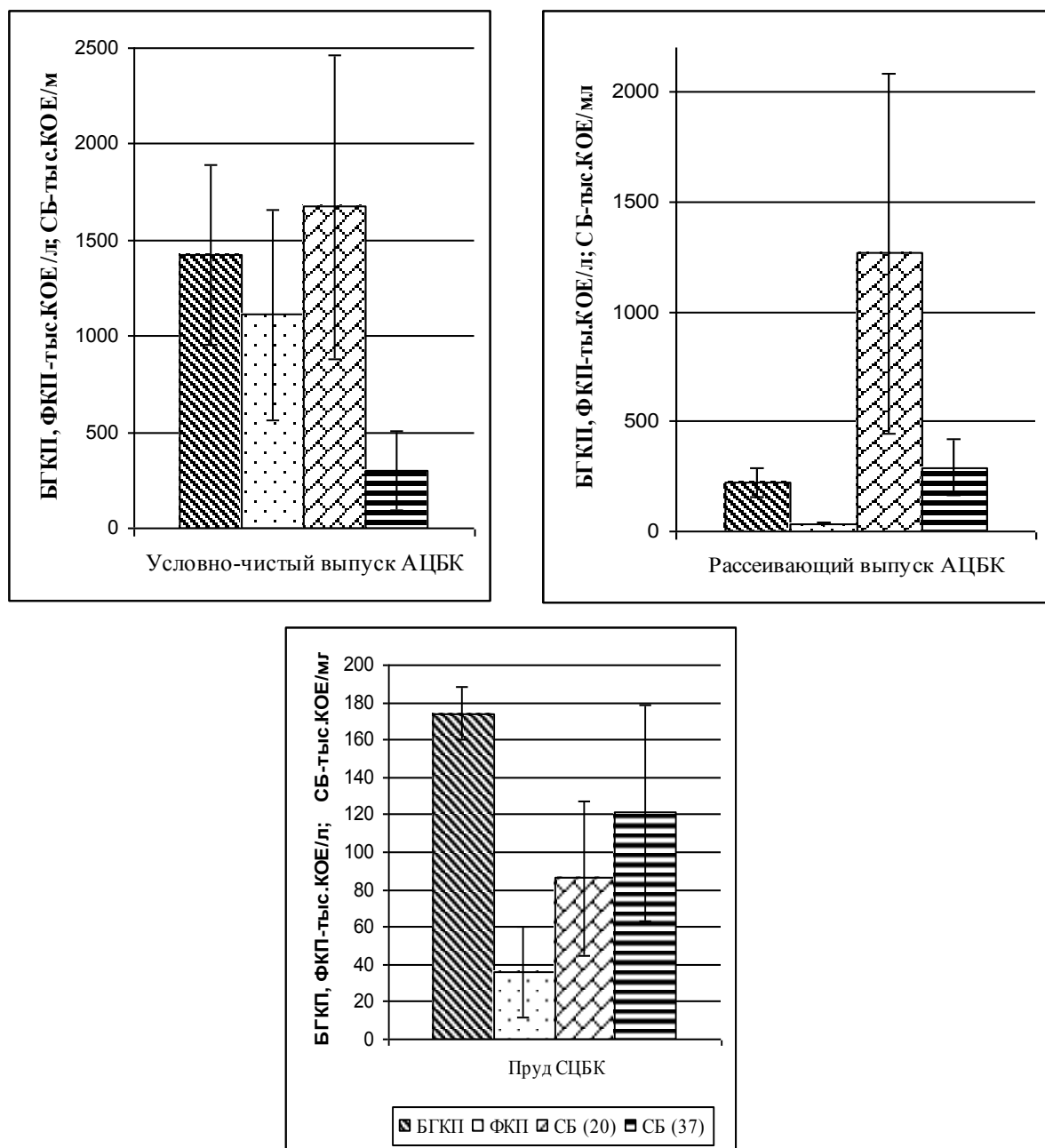


Рис.5. Колебания численности гетеротрофных бактерий в сточных водах Архангельского и Соломбальского ЦБК

Нами была проведена серия опытов по изучению выживаемости фекальной кишечной палочки *Escherichia coli* в условиях естественного



микробиоценоза водотока, при совместном культивировании её с дрожжеподобными грибами рода *Candida*, а также - с зелеными водорослями *Scenedesmus quadricauda*. Динамика отмирания кишечной палочки в модельных водоемах имела однонаправленный характер: постепенное снижение численности *E. coli* к 87 дню и достижение минимальных значений к 108 суткам. При совместном культивировании с дрожжами рода *Candida* к 5 дню происходит повышение коли - индекса в 2 раза, затем медленное уменьшение концентрации *E. coli* до 108 дня и минимальное значение наблюдали к 116 дню. Совместное культивирование с зелеными водорослями снижает численность кишечных палочек к 76 и 56 дням в зависимости от исходной концентрации фитопланктона 0.45 и 1.65 млн.кл/мл. Следует отметить, что кишечная палочка, достигнув минимальных значений численности, продолжает высеваться до конца эксперимента в течение полугода в концентрациях 200 КОЕ/л.

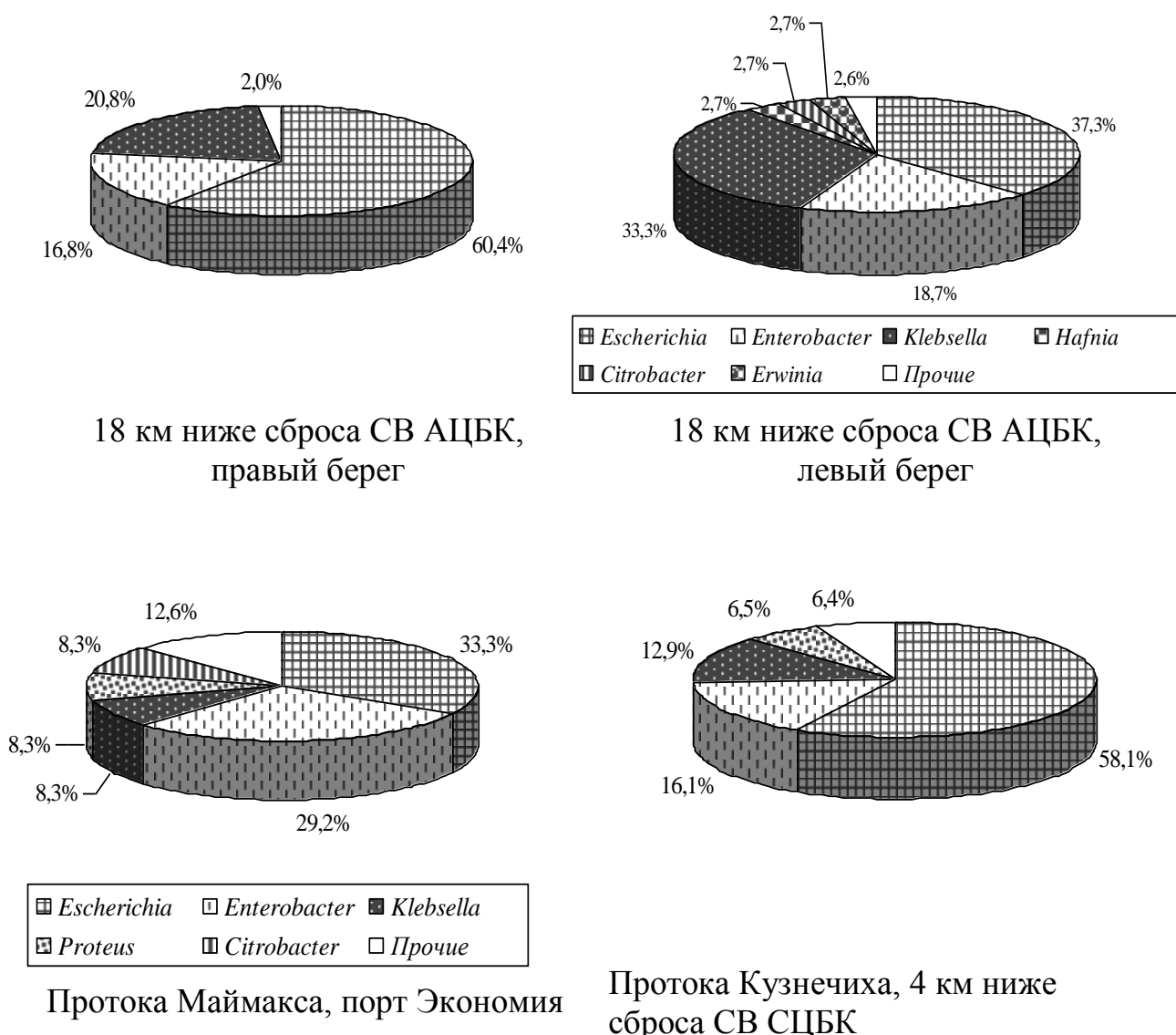


Рис. 6. Таксономический состав энтеробактерий по биотопам

Полученные результаты позволяют предположить, что собственные гетеротрофные микроорганизмы водотока не вступают в конкурентные взаимоотношения с представителями фекального загрязнения воды, а наоборот, происходит взаимодействие, ведущее к размножению эшерихий и увеличению длительности их выживания. Естественно предположить, что в этих условиях заметно повышаются адаптационные свойства энтеробактерий, меняются их фенотипические возможности, создаются предпосылки для их активного участия в деструкции химических загрязнителей.

Известно (Бухарин и др., 1999; Fujie et al., 1996; Serrano et al., 2001), что благодаря высокому адаптационному потенциалу, энтеробактерии являются активными участниками процессов самоочищения вод. Ю.Г. Талаева с соавторами (1982) и Р.Ф. Хуснарязанова (1998) экспериментально доказали стимулирующее размножения энтеробактерий и увеличение сроков их выживания при культивировании с добавлением нефтепродуктов, фенола. О.В.Бухарин (1999) в лабораторных условиях определил способность к адаптации *E.coli* к нефтяным углеводородам и фенолу.

Основными автохтонными и доминирующими родами энтеробактерий в водной экосистеме устья Северной Двины являются *Klebsiella* и *Enterobacter*, ввиду специфичности поступающих вод в реку, ибо основная масса автохтонных энтеробактерий поступает с болот. С другой стороны, со смешанными промышленными сточными водами в водоем поступает значительное количество бактерий семейства Enterobacteriaceae, которые уже адаптированы к различным химическим загрязнениям.

Нами показано, что в устьевой области реки Северная Двина в деструкции солярового масла принимали активное участие и бактерии из семейства Enterobacteriaceae виды *Klebsiella planticola*, *Enterobacter dissolvens*, *Escherichia coli*. Наиболее часто выделялась *Klebsiella planticola*. Углеводороды являются обычными компонентами органического вещества в водных экосистемах и наземных растениях, поскольку постоянно синтезируются биотой. В связи с этим вполне очевидно предположить, что энтеробактерии могут быть адаптированы к их окислению.

Культуры *Klebsiella planticola*, *Escherichia coli*, *Enterobacter dissolvens*, использованные нами в эксперименте, были выделены из ассоциации микроорганизмов, утилизирующих соляровое масло. В условиях опыта в минеральной питательной среде Ворошиловой - Диановой с добавлением стерильного солярового масла в качестве единственного источника углерода и энергии, культуры *Escherichia coli* подвергали разложению n-алканы в диапазоне от C<sub>14</sub> до C<sub>18</sub>; C<sub>24</sub>, C<sub>25</sub>; по сравнению с контролем массовая доля этих n-алканов снизилась на 33.6%.

Культура *Klebsiella planticola* наиболее активно разлагала n-алканы в диапазоне C<sub>13</sub>-C<sub>22</sub>, а культура *Enterobacter dissolvens* – C<sub>14</sub>-C<sub>21</sub>. По сравнению с контролем массовая доля n-алканов понизилась соответственно на 53.3 и 48.5% (Рис.7).

Об интенсивности разрушения нефтяных углеводородов энтеробактериями судили по потенциальной окислительной способности (табл.3). Результаты показали, что все три исследованные культуры хорошо разрушают нефтяные углеводороды. При проведении эксперимента по определению потенциальной окисляющей способности культур с плотностью 100 тыс. кл/мл было отмечено полное потребление кислорода. Заметное потребление кислорода этими культурами сохраняется и при меньшей их плотности. При этом цитратутилизирующие энтеробактерии *Kl.planticola* и *E.dissolvens* характеризовались более высокой потенциальной окислительной способностью.

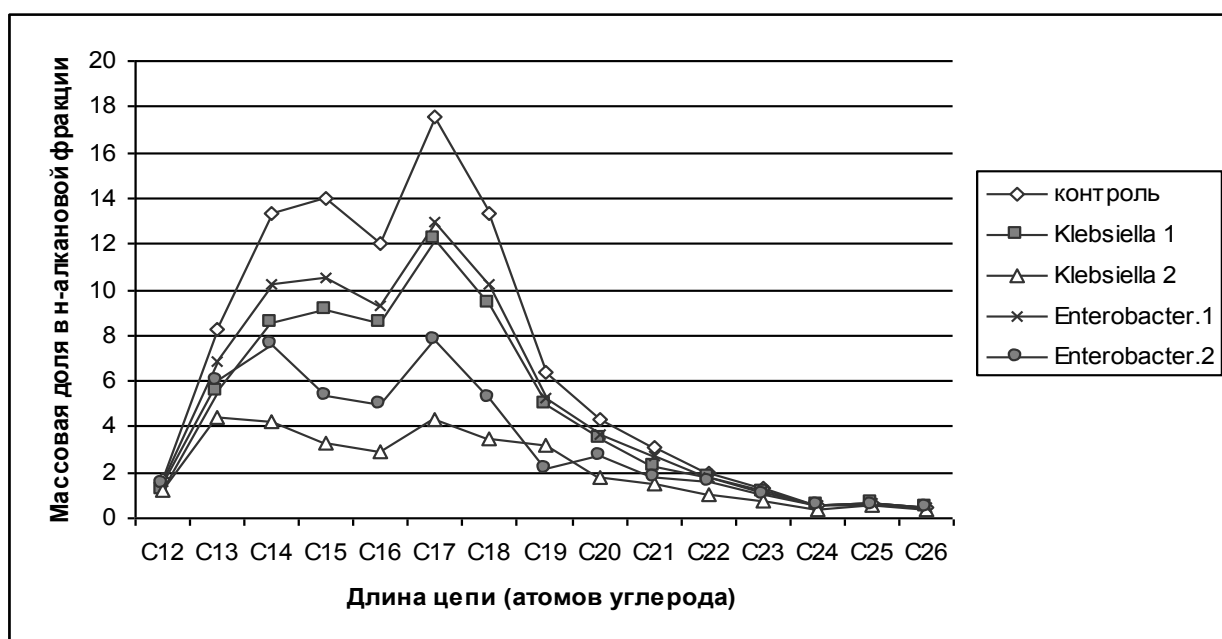


Рис. 7. Деструкция н-алканов солярового масла культурами *Klebsiella planticola* и *Enterobacter dissolvens*: *Klebsiella* 1, *Enterobacter* 1 - культивирование в течении 2 недель; *Klebsiella* 2, *Enterobacter* 2 - культивирование в течении 1 месяца.

Таблица 3

**Потенциальная окислительная способность разрушения нефтяных углеводородов энтеробактериями (мг O<sub>2</sub>/(лхсут))**

Численность бактерий	<i>Klebsiella planticola</i>	<i>Enterobacter dissolvens</i>	<i>Escherichia coli</i>
100 тыс. кл/мл	4.35	4.33	3.38
30 тыс. кл/мл	1.35	1.15	0.64

По нашему мнению, наиболее перспективным для дальнейших исследований, является культура *Klebsiella planticola*. Данная культура абсолютно безвредна для человека, т.к. является сапротрофным видом с азотфиксирующими (Пищик и др., 1997; Постников и др., 2002) и фосфатаккумулирующими (Саралов и др., 2001) свойствами.

Бактерии, разрушающие углеводородные соединения нефти, широко распространены в водах устьевой области реки Северная Двина. Количество их варьирует в пределах  $10^1$ - $10^5$  клеток на 1 мл в зависимости от места и времени отбора проб. По таксономическому составу в фоновых биотопах были выделены: *Pseudomonas* и пигментированные коринеподобные бактерии. На станциях, подверженных антропогенному влиянию, обнаруживался широкий спектр: пигментированные и не пигментированные коринеподобные бактерии, *Pseudomonas*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*.

### ВЫВОДЫ

1. Интенсивная антропогенная нагрузка на водную экосистему устьевой области реки Северная Двина обуславливает снижение численности фитопланктона и увеличение плотности гетеротрофного бактериопланктона.
2. Основными источниками поступления аллохтонных микроорганизмов в устье Северной Двины являются сточные воды АЦБК и СЦБК; наиболее высокие плотности микроорганизмов установлены в воде условно-чистого выпуска АЦБК.
3. Фоновые биотопы водоема характеризуются преобладанием численности факультативно олиготрофных бактерий над эвтрофными; при увеличении антропогенного влияния возрастает концентрация эвтрофных микроорганизмов.
4. Сезонные колебания численности гетеротрофного бактериопланктона зависят от взаимодействия комплекса абиотических и биотических факторов среды, и данная группа бактерий является активным участником процессов деструкции органических веществ в устье реки Северная Двина, что подтверждается регрессионным и корреляционным анализами.
5. Места интенсивного загрязнения характеризуются расширенным спектром микробиоценоза с увеличением таксономического богатства бактерий семейства Enterobacteriaceae до 5 - 6 родов с 1 - 2-х на фоновых станциях.
6. Установлена возможность длительного сохранения *Escherichia coli* в пробах речной воды до 108 дней; увеличение сроков выживания до 116 дней наблюдается при добавлении культур *Candida tropicalis*; снижение срока выживания до 56 дней отмечено в присутствии зеленых водорослей *Scenedesmus quadricauda*.
7. Впервые выявлено, что *Klebsiella planticola*, *Enterobacter dissolvens*, *Escherichia coli* являются активными деструкторами нефтепродуктов в исследуемом районе.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Воробьева Т.Я. Микробиологические исследования Бассейна и Горла Белого моря / Воробьева Т.Я., Забелина С.А., Тарханов С.Н. // Тезисы докладов международной конференции «Поморье в Баренц - регионе: Экология, экономика, социальные проблемы, культура». Архангельск, 1997. С. 27-28.
2. Воробьева Т.Я. Микробиологическая индикация загрязнений р. Сев. Двины в районе Архангельского ЦБК / Забелина С.А., Воробьева Т.Я. // Тезисы докладов международной конференции молодых ученых и специалистов «Экология-98». Архангельск, 1998. С.77.
3. Воробьева Т.Я. Результаты микробиологического исследования реки Северной Двины в июле 1998 г. / Кузнецов В.С., Забелина С.А., Воробьева Т.Я. / Сб. «Экология Северной Двины», Архангельск, 1999. С.137-142.
4. Воробьева Т.Я. Микробиологические исследования реки Северной Двины в июле 1998 г. / Воробьева Т.Я., Забелина С.А. // Материалы международной конференции «Геодинамика и геоэкология». Архангельск, 1999. С.58-59.
5. Воробьева Т.Я. Состояние планктонных сообществ устьевой области реки Северной Двины в зоне влияния Архангельского ЦБК / Забелина С.А., Тарасова Н.А., Воробьева Т.Я. // Материалы международной конференции «Поморье в Баренц - регионе на рубеже веков: экология, экономика, культура». Архангельск, 2000. С. 82.
6. Воробьева Т.Я. Исследование рек юго - восточной части Беломорско - Кулойского плато / Кузнецова В.М., Воробьева Т.Я., Забелина С.А. и др. // Материалы международной конференции «Поморье в Баренц - регионе на рубеже веков: экология, экономика, культура». Архангельск, 2000. С. 131-132.
7. Воробьева Т.Я. Микроорганизмы – индикаторы загрязнения вод нефтепродуктами и фенолами / Воробьева Т.Я., Забелина С.А. // Материалы международной конференции «Поморье в Баренц - регионе на рубеже веков: экология, экономика, культура». Архангельск, 2000. С. 49.
8. Воробьева Т.Я. Аллохтонная микрофлора в зоне влияния Архангельского и Соломбальского ЦБК / Воробьева Т.Я., Забелина С.А. // Тезисы докладов III (XXVI) международной конференции «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов европейского Севера». Сыктывкар, 2003. С. 20.
9. Воробьева Т.Я. Реакция гидробионтов различного трофического уровня экосистемы устьевой области реки Северная Двина на сточные воды Архангельского ЦБК / Воробьева Т.Я., Собко Е.И., Забелина С.А. и др. // Материалы всероссийской конференции «Стратегия развития северных регионов России». Архангельск, 2003. С. 278-281.
10. Воробьева Т.Я. Пространственно-временная структура бактерий семейства Enterobacteriaceae в устье Северной Двины / Воробьева Т.Я., Добродеева Л.К. // «Экология человека», (приложение, Материалы Всероссийской конференции с международным участием), №4, Т.2, Архангельск: СГМУ, 2004. С. 97-100.