

На правах рукописи

ЗАБЕЛИНА Светлана Александровна

**СОСТОЯНИЕ СООБЩЕСТВ ДРОЖЖЕПОДОБНЫХ ГРИБОВ
УСТЬЕВОЙ ОБЛАСТИ РЕКИ СЕВЕРНАЯ ДВИНА В УСЛОВИЯХ
МНОГОЛЕТНЕГО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ**

03.00.16 — экология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Сыктывкар – 2005

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время все более актуальной становится проблема изменения окружающей среды под влиянием антропогенных факторов. Одним из таких факторов является биологическое загрязнение. Широкое применение микроорганизмов в биотехнологии приводит к поступлению в окружающую среду промышленных штаммов. В связи с увеличением объема продукции биотехнологии возрастает роль биологического компонента загрязнения окружающей среды (промышленные микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности). В результате поступления выбросов предприятий биотехнологии в атмосферу и водную среду может произойти нарушение естественных микробоценозов, процессов самоочищения в почве и водных объектах, увеличение выживаемости патогенных микроорганизмов. Это представляет угрозу как в эпидемиологическом отношении, так и в плане нарушения экологического равновесия в природных экосистемах.

Устьевая область реки Северная Двина, где сосредоточены крупные населенные пункты, промышленные и сельскохозяйственные предприятия и, кроме того, интегрируется загрязнение всего бассейна реки, является экологически неблагоприятным районом. На Архангельских предприятиях комплексной переработки древесины в течение 30 лет производились кормовые дрожжи, штаммы-продуценты которых в значительных количествах присутствовали в сточных водах. В качестве продуцентов кормового белка использовались грибы рода *Candida*, *Trichosporon*. До настоящего времени не изучено влияние на естественный микробоценоз длительного поступления дрожжеподобных грибов со сточными водами в устье реки, неизвестны также масштабы их распространения.

Целью исследования являлось изучение пространственного распределения, структуры и динамики численности дрожжеподобных грибов устьевой области реки Северная Двина в условиях многолетнего микробиологического загрязнения.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить концентрации и таксономический состав дрожжеподобных грибов в стоках двух предприятий комплексной переработки древесины.
2. Исследовать пространственное распределение и сезонную динамику численности дрожжеподобных грибов в структуре гетеротрофной микрофлоры воды устьевой области р. Северная Двина.
3. Изучить таксономический состав дрожжеподобных грибов речной воды с учетом степени загрязнения и его изменения в результате деятельности производств кормового белка.
4. Оценить связь численности дрожжеподобных грибов с абиотическими и биотическими факторами среды (температура, минерализация, концентрация кислорода, легкоокисляемого органического вещества, биогенных элементов, содержание фитопланктона, бактериопланктона).
5. Установить выживаемость грибов рода *Candida* в речной воде.

Научная новизна работы. Впервые проведена оценка воздействия на водное микробное сообщество интенсивного и длительного микробиологического загрязнения промышленными штаммами дрожжеподобных грибов. Изучено пространственное распределение и сезонная динамика численности дрожжеподобных грибов в воде устья р.Северная Двина, их относительное обилие в гетеротрофном микробоценозе. Доказано, что многолетнее микробиологическое загрязнение не привело к нарушению состояния естественного водного гетеротрофного бактериального сообщества.

Впервые получены сведения о таксономической принадлежности выделенных из воды р.Северная Двина дрожжеподобных грибов. Установлена способность к сохранению жизнедеятельности дрожжеподобных грибов рода *Candida* в донных отложениях реки Северная Двина в течение 7 лет после прекращения производства кормовых дрожжей. Выявлено, что сохранению и поддержанию жизнедеятельности этих грибов в донных отложениях способствует поступление грибов и органических веществ со сточными водами.

Практическая значимость. Полученные данные являются основой для дальнейших мониторинговых исследований и наблюдений за последствиями биологического загрязнения и прогноза возможных изменений в будущем. Информация о содержании дрожжеподобных грибов может быть использована для разработки критериев оценки биологического загрязнения. Результаты изучения численности, распределения гетеротрофной микрофлоры рекомендуются для комплексной гидробиологической оценки качества воды. Сведения о биологическом загрязнении и длительном его сохранении в водных экосистемах могут быть использованы в учебном процессе при подготовке экологов, биотехнологов, биологов, эпидемиологов.

Личный вклад автора. Автором определены цель и задачи, подготовлена программа исследований. Отбор проб воды и микробиологические анализы проведены при непосредственном участии автора совместно с сотрудниками лаборатории водных экосистем ИЭПС УРО РАН. Автором проведен весь комплекс работ по определению таксономической принадлежности дрожжеподобных грибов, выполнена математическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов.

Положения, выносимые на защиту.

1. Высокие концентрации дрожжеподобных грибов в устьевой области реки Северная Двина, изменение таксономической структуры и биоразнообразия природного дрожжевого сообщества в зоне влияния источников загрязнения (доминирование грибов рода *Candida*) являются следствием многолетнего микробиологического загрязнения.
2. Грибы рода *Candida*, используемые в качестве продуцентов кормового белка, заняли экологическую нишу в сообществах микроорганизмов донных отложений реки. Сохранению и поддержанию жизнедеятельности

этих грибов в донных отложениях способствует поступление аллохтонных органических веществ и грибов со сточными водами.

3. Выявленные в период исследования уровни содержания в воде дрожжеподобных грибов не нарушают структуру естественного водного гетеротрофного бактериального сообщества.

Апробация работы и публикации. Материалы диссертации были представлены на молодежной конференции «Экология 1998» (Архангельск, 1998); Международной конференции «Геодинамика и геоэкология» (Архангельск, 1999); Международной конференции «Экология северных территорий России. Проблемы, прогноз, ситуации, пути развития, решения» (Архангельск, 2002); 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). По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части в четырех главах, включая описание объектов и методов исследования, заключения, выводов. Работа иллюстрирована 21 рисунком и 13 таблицами. Список литературы включает 185 источников, в том числе 58 - на иностранных языках.

Благодарности.

Автор искренне благодарит научного руководителя д.м.н. Л.К. Добродееву за содействие и постоянное внимание к работе, к.м.н. В.М. Кузнецову за организацию исследований, сотрудников лаборатории водных экосистем ИЭПС УрО РАН за содействие и помощь в сборе материала. Особая признательность к.х.н. Г.И. Поповой, к.б.н. Н.А. Прожериной за консультации. Автор глубоко признателен всем коллегам за советы и критические замечания при написании работы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Распространение и роль дрожжеподобных грибов в водных экосистемах

В главе проведен анализ литературы, обобщены результаты исследований по распространению и таксономическому составу дрожжеподобных грибов в водных экосистемах, об их роли в самоочищении водных экосистем. Рассмотрены проблемы, связанные с биологическим загрязнением окружающей среды в результате деятельности предприятий биотехнологии. Дрожжеподобные грибы широко распространены в водных экосистемах, различных по гидрологическим, гидрохимическим и гидробиологическим условиям (Родина, 1950; Розанова, Новожилова, 1958; Тютенькова, 1971; Новожилова и др., 1979; Колесницкая, Максимова, 1982; Квасников и др., 1982; Земская, 1986; Morais et al, 1996; Slavikova, Vadkertiova, 1997). Преобладающими в водных экосистемах, как правило,

являются дрожжи родов *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Torulopsis*. Доминирование и относительно высокое содержание грибов рода *Candida* связано, главным образом, с загрязненными промышленными и коммунально-бытовыми стоками водами (Хуснаризанова, 1998; Abu-Elteen et al, 1997; Nagler, Ahearn, 1987; Qureshi, 1979; Slavikova, 1997).

В связи с увеличением объема продукции биотехнологических производств возрастает роль биологического загрязнения окружающей среды (промышленные микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности), прямо или косвенно воздействующего на здоровье человека. Это делает актуальным изучение соответствующих микроорганизмов в различных объектах окружающей среды. Необходимость изучения поведения микроорганизмов-интродуцентов в окружающей среде для прогнозирования и предотвращения нежелательных последствий отмечают П.А. Кожевин с соавт. (1982), И.С. Куличевская (1995), В.В. Королик с соавт. (1993), Д.С. Станкевич (2000).

Глава 2. Краткая физико-географическая и гидрохимическая характеристика устьевой области Северной Двины

В главе приведены сведения о природных условиях устьевой области р. Северная Двина, дана гидрологическая и гидрохимическая характеристика исследуемого района. Устье Северной Двины можно отнести к числу наиболее урбанизированных, промышленно и транспортно освоенных объектов на Европейском Севере России. В последние десятилетия во всем мире большое внимание уделяется изучению приливных устьев рек в связи с тем, что они являются фильтрами и накопителями разного рода загрязнений, поступающих с речным стоком. Это обуславливает значительную сложность процессов формирования качества устьевых вод, что, в свою очередь, вызывает большие затруднения при оценке их состояния и сохранения экологической безопасности.

Глава 3. Объекты и методы исследований

Объектом исследований служили сообщества дрожжеподобных грибов и сапрофитных бактерий воды устьевой области р. Северная Двина, сточных вод (СВ) Архангельского ЦБК и Соломбальского ЦБК. Район исследований представлен на рис.1. Наблюдения проводились на 28 станциях. За фоновую принята станция, расположенная в 30 км выше сброса Архангельского ЦБК. Пробы воды отбирали на малой воде в гидрологические сезоны: зимнюю межень, на спаде весеннего половодья, летнюю межень и осенью (перед ледоставом). Для получения информации о влиянии гидродинамических условий реки на распространение дрожжей проводился отбор проб воды в различные фазы приливо-отливного цикла. В период 2000-2003 гг. было отобрано 280 проб речной воды, 36 проб СВ АЦБК, 16 проб СВ СЦБК. Общее число анализов микробиологических показателей составило около 2500. Число определений микро- и макроморфологических признаков составило более 800, физиологических и биохимических признаков около 2400.

Воду для микробиологических анализов отбирали с борта катера стерильным бутылочным пробоотборником в стерильную посуду (Методические указания..., 1981; Кузнецов, Дубинина, 1989). Данные по физико-химическому состоянию вод за 2000-2001 гг. предоставлены Северным межрегиональным территориальным управлением по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды. Физико-химический и гидробиологический анализ воды за 2002 г. проводился в лаборатории водных экосистем ИЭПС УрО РАН. Данные по содержанию грибов рода *Candida* за 1978-1979 гг. в воде реки Северная Двина и сточных водах Архангельского и Соломбальского ЦБК предоставлены научным руководителем д.м.н. Л.К. Добродеевой.



Рис. 1. Карта-схема района исследований (1-13 – номера постоянных станций отбора проб воды).

В пробах речной и сточных вод определяли численность дрожжеподобных грибов (ДГ), сапрофитных бактерий (СБ), вырастающих при 37°C и 20°C. Численность СБ определяли методом глубинного посева на сухом питательном агаре (СПА) (Методические указания..., 1981). Бактериологические показатели определяли для установления влияния поступления дрожжеподобных грибов в экосистему устья Северной Двины

на гетеротрофное сообщество микроорганизмов. Поскольку нас интересовали прежде всего дрожжи, применяемые в микробиологической промышленности, а они относятся к карбофильным, мезофильным микроорганизмам, и в гетеротрофном сообществе водной экосистемы вступают в конкуренцию по типу питания в основном с эвтрофными бактериями, то и относительное обилие дрожжей в гетеротрофном сообществе оценивали, сравнивая рост дрожжей с сапрофитными бактериями, вырастающими на богатой органическим веществом среде при 20°C и при 37°C.

Определение количества дрожжеподобных грибов проводили в соответствии с методикой (Бабьева, Голубев, 1979) с нижеперечисленными модификациями. В качестве питательной среды использовалась среда Сабуро, производства фирмы "Hispanlab" следующего состава: декстроза – 40 г, пептон – 10 г, агар – 15 г, вода дистиллированная – 1 л. Посевы инкубировали при комнатной температуре 18-20°C. Для подавления роста бактерий в среду добавляли левомицетин в количестве 100 мг/л. Предварительные опыты, проведенные с использованием сусло-агара, среды Чапека и Сабуро показали, что наиболее перспективной средой для выделения дрожжеподобных грибов из речной и сточных вод является среда Сабуро-декстрозный агар.

Структуру комплексов дрожжеподобных грибов анализировали на уровне таксономических групп дрожжей родового уровня. Для каждого проанализированного образца определяли общую численность дрожжей и относительное обилие каждого из выявленных родов, которое рассчитывали как процентное содержание от общего числа учитываемых таксонов. Морфологические, культуральные и физиологические свойства дрожжей проводили по методикам, описанным в руководстве (Бабьева, Голубев, 1979). Идентификацию проводили по данным определителя Lodder (1970).

Влияние биологического загрязнения на состояние природных комплексов дрожжеподобных грибов определяли по таксономическому разнообразию дрожжевых сообществ в биотопах с различной интенсивностью техногенного воздействия, которое оценивали по индексам разнообразия и выравнимости Шеннона (Бигон, Харпер, Таунсенд, 1989).

В серии опытов проведено изучение выживаемости грибов рода *Candida* в речной воде в модельных водоемах. Оценка состояния микробной системы проводилась с помощью количественного учета сапрофитных бактерий и грибов рода *Candida*. Посевы проводили при постановке опыта и через сутки, в первый месяц – через 3-5 дней, в следующие месяцы – 2 раза в месяц. Наблюдения за выживаемостью дрожжей проводились в течение 4-х месяцев.

Все данные обработаны статистически с применением корреляционного, кластерного, однофакторного дисперсионного анализов (ОДА) с использованием программ Excel 97, Statistica 5.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Глава 4. Содержание и таксономический состав дрожжеподобных грибов в сточных водах ЦБК

В главе представлены результаты исследования концентрации и таксономического состава дрожжеподобных грибов в сточных водах Архангельского ЦБК (рассеивающий выпуск (РВ), условно-чистый выпуск (УЧВ), усреднитель) и Соломбальского ЦБК.

Производство кормовых дрожжей на АЦБК осуществлялось с 1966 по 1997г., на Архангельском гидролизном заводе, сточные воды которого поступали на очистные сооружения СЦБК – с 1966 по 1995 г.

Исследования сточных вод АЦБК через 3-5 лет после прекращения производства кормовых дрожжей, выявили в 2000-2001 гг. незначительное снижение содержания грибов рода *Candida* в рассеивающем выпуске по сравнению с периодом активного функционирования производства (табл.1). В 2002 отмечается резкое уменьшение концентрации грибов. Тем не менее, содержание *Candida* в условно-чистом выпуске остается достаточно высоким и элиминации дрожжей на всех этапах очистки не происходит.

Таблица 1

Концентрация грибов рода *Candida* в сточных водах АЦБК и СЦБК, М±m, тыс. КОЕ/л

Сточные воды	1978-1979г.г.	2000-2001 г	2002 г.
РВ АЦБК	500.0±100.0	386.8±74.5	24.0±3.0
УЧВ АЦБК	2089.1±733.5	-	651.9±227.4
Усреднитель АЦБК	5860.8±1517.1	3337.5±275.3	806.7±197.8
СВ СЦБК	22.8±17.7	-	3.2±1.2

Сохранение жизнедеятельности дрожжей на очистных сооружениях АЦБК обусловлено поступлением со сточными водами благоприятного субстрата, содержащего легкоусвояемую органику. Как правило, формирование биоценозов активного ила складывается спонтанно и практически структура его в каждом конкретном очистном сооружении является уникальной (Печуркин, 1990). По-видимому, на очистных сооружениях АЦБК сложился микробоценоз активного ила, в который вошли адаптированные к новым условиям дрожжи, которые использовались в качестве продуцентов кормового белка.

Численность дрожжей в сточных водах СЦБК, по сравнению со стоками АЦБК, была значительно ниже и составила в пруде-аэраторе, из которого стоки поступают через речку Хатарису в протоку Кузнечиху – 3.2±1.2 тыс. КОЕ/л (пределы колебаний от 1.00 до 9.00 тыс. КОЕ/л). Различие в содержании дрожжей в стоках АЦБК и СЦБК может быть объяснено технологическими особенностями очистки сточных вод. Стоки Архангельского гидролизного завода поступали на очистные сооружения СЦБК не сразу после производственного процесса, а через этап накопления в аэротенке и только после этого - на очистные сооружения СЦБК. На этапе

накопления сточных вод в аэротенке происходил процесс осаждения дрожжей.

Несмотря на высокую численность дрожжеподобных грибов в сточных водах, относительное обилие данных микроорганизмов в гетеротрофном микробоценозе сточных вод невелико и в среднем составляет в стоках АЦБК и СЦБК 0.04% и 0.004% соответственно.

Из сточных вод АЦБК и СЦБК были выделены дрожжи родов *Candida*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Cryptococcus* (рис.2). Доминирующими в дрожжевых сообществах во всех сточных водах были грибы рода *Candida*, что свидетельствует о сохранении адаптированных промышленных штаммов на очистных сооружениях.

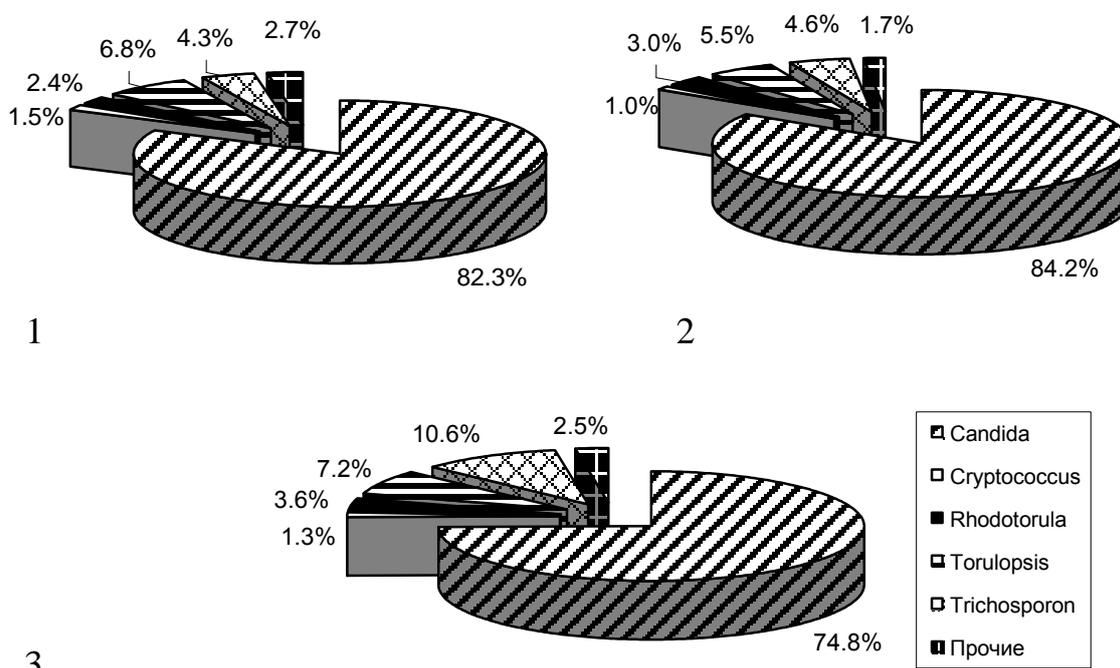


Рис. 2. Таксономический состав дрожжеподобных грибов в сточных водах ЦБК: 1 – РВ АЦБК, 2 – УЧВ АЦБК, 3 – СВ СЦБК.

Глава 5. Пространственное распределение и сезонная динамика дрожжеподобных грибов в воде устьевой области Северной Двины в условиях многолетнего микробиологического загрязнения

В главе представлены данные о горизонтальном, вертикальном распределении дрожжеподобных грибов в сравнении с сапрофитными бактериями, сезонной динамике численности изучаемых микроорганизмов, влиянии приливо-отливной деятельности на распространение микроорганизмов.

Изучение количественного содержания данных групп микроорганизмов в пробах воды устьевой области Северной Двины показало, что численность их сильно варьирует по станциям и зависит от источников загрязнения. Содержание дрожжеподобных грибов в воде реки колеблется в широких пределах от 0.4 тыс. КОЕ/л до 60.0 тыс. КОЕ/л (рис.3). Максимальные

величины численности дрожжей во много раз превосходят наблюдаемые многими авторами (Земская, Новожилова, 1980; Колесницкая, Максимова, 1982; Нечесов, Булгадаева, 1984; Максимова, Максимов, 1989; Kockova-Kratochvilova et al, 1989; Morais, Resende et al, 1996) в пресноводных экосистемах, незагрязненных сточными водами, где содержание дрожжеподобных грибов составляет от десятков до сотен клеток на литр.

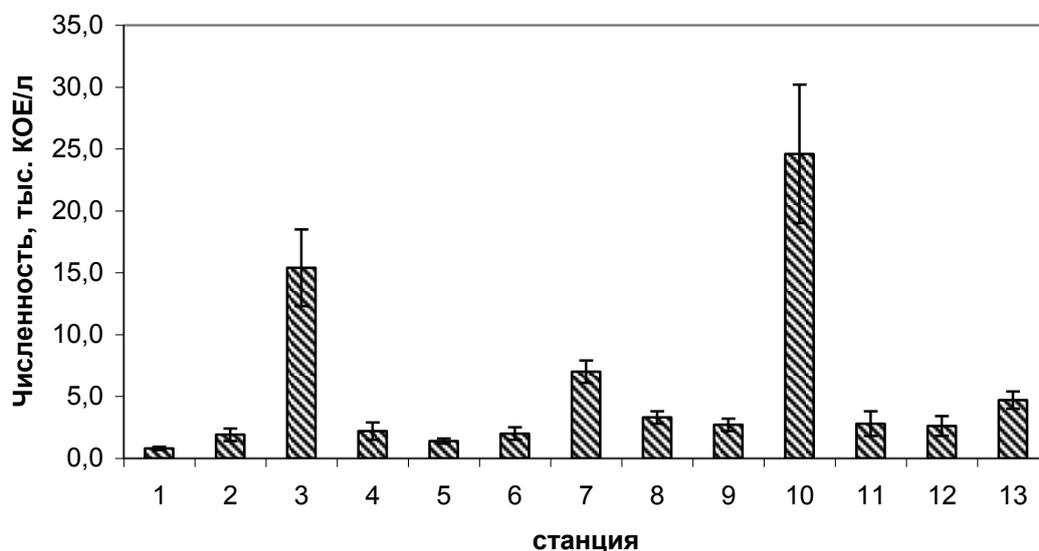


Рис. 3. Распределение дрожжеподобных грибов в устьевой области Северной Двины (средние данные за 2000-2002 гг.).

Наиболее высокие концентрации дрожжей в воде обнаружены вблизи предприятий, на которых осуществлялось производство кормового белка - в протоке Маймакса (от 4.5 до 60.0 тыс.КОЕ/л) (ст.10), где расположен Архангельский гидролизный завод, и в районе влияния сточных вод Архангельского ЦБК (от 5.5 до 39.8 тыс.КОЕ/л) (ст.3). Рассматривая различные компоненты гетеротрофного микробного сообщества, мы выявили, что в содержании сапрофитных бактерий в воде устья реки отмечены те же закономерности, что и для дрожжей – значительная амплитуда колебаний (СБ, 37°С 0.02-14.26 тыс.КОЕ/мл, СБ, 20°С 0.09-67.76 тыс.КОЕ/мл), обусловленная сезонной изменчивостью и зависимостью от источников загрязнения. Высокая вариабельность количественных показателей гетеротрофных микроорганизмов характерна для всех станций и зависит от многих факторов, наиболее важными из которых являются сезонная изменчивость, поступление аллохтонной органики и аллохтонной микрофлоры от источников загрязнения. Известно, что коммунально-бытовые и сточные воды, поступающие с биологических очистных сооружений (БОС) содержат значительное количество аллохтонной микрофлоры (Хуснаризанова, 1998). Вследствие нестабильности работы БОС, наибольшие колебания количественных показателей характерны для районов, находящихся под влиянием сточных вод (ст.3, 7, 10, 11, 12).

В районе влияния стоков АЦБК содержание гетеротрофных микроорганизмов, в том числе и дрожжей, в пробах воды во время всего периода наблюдений было выше на левобережных станциях (ст. 3, 7) реки (рис.4) по сравнению со станциями, находящимися по правому берегу (ст. 5, 6). Это связано с тем, что сточные воды АЦБК во время отлива распространяются достаточно узкой полосой вдоль левого берега реки, не доходя даже до середины, что также было отмечено ранее в исследованиях В.Ф. Бреховских с соавт. (1997, 2000). Далее сточные воды попадают в Никольский рукав, не распространяясь в другие рукава.

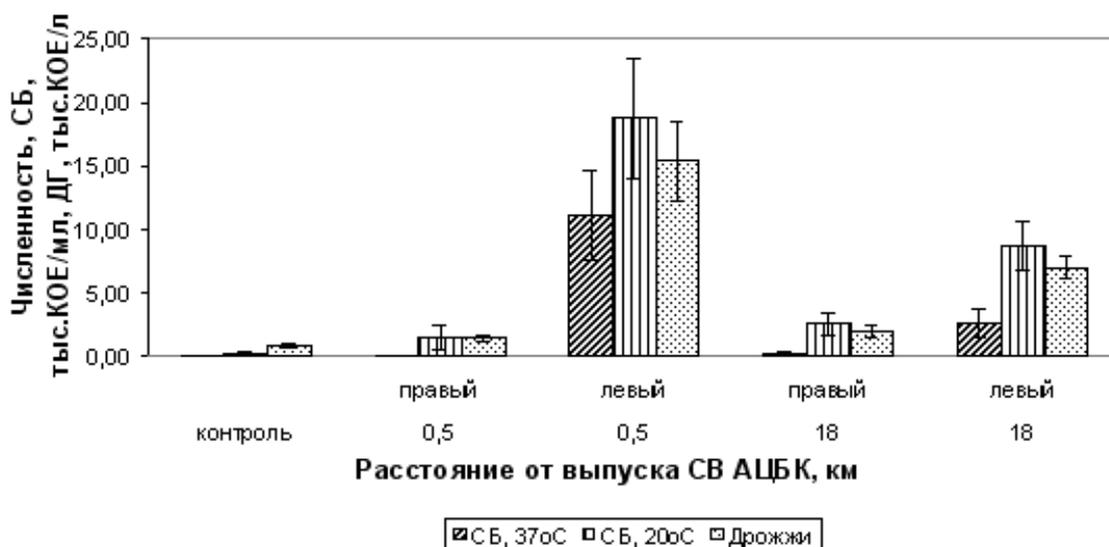


Рис. 4. Распространение дрожжеподобных грибов в сравнении с сапрофитными бактериями в воде устья Северной Двины в зависимости от близости к выпуску сточных вод АЦБК (средние данные за 2000-2002 гг.).

Так, в месте ответвления протоки Кузнечихи и Корабельного рукава, концентрация дрожжеподобных грибов не превышает 1.5 тыс. КОЕ/л. Различия между содержанием микроорганизмов на правом и левом берегу статистически достоверны, что подтверждается результатами однофакторного дисперсионного анализа ($p < 0.01-0.001$). Полученные данные свидетельствуют о том, что сточные воды АЦБК являются источником микробиологического загрязнения воды Северной Двины. Со сточными водами в природные экосистемы поступают загрязняющие вещества, которые являются питательными веществами для микроорганизмов. При этом преимущественно развиваются те микроорганизмы, которые способны утилизировать поступающие вещества. Учитывая, что микроорганизмы обладают уникальной адаптационной способностью к неблагоприятным условиям окружающей среды, имеют огромный биохимический потенциал, который позволяет им использовать антропогенные загрязняющие вещества в качестве субстратов и источников энергии, возрастает роль аллохтонной микрофлоры в самоочищении водоемов.

Кластерный анализ подтвердил обнаруженные нами закономерности в пространственной организации исследуемого сообщества (рис.5). На диаграмме видно наличие трех групп станций, объединенных в кластеры, достоверно различающихся по параметрам микробоценоза.

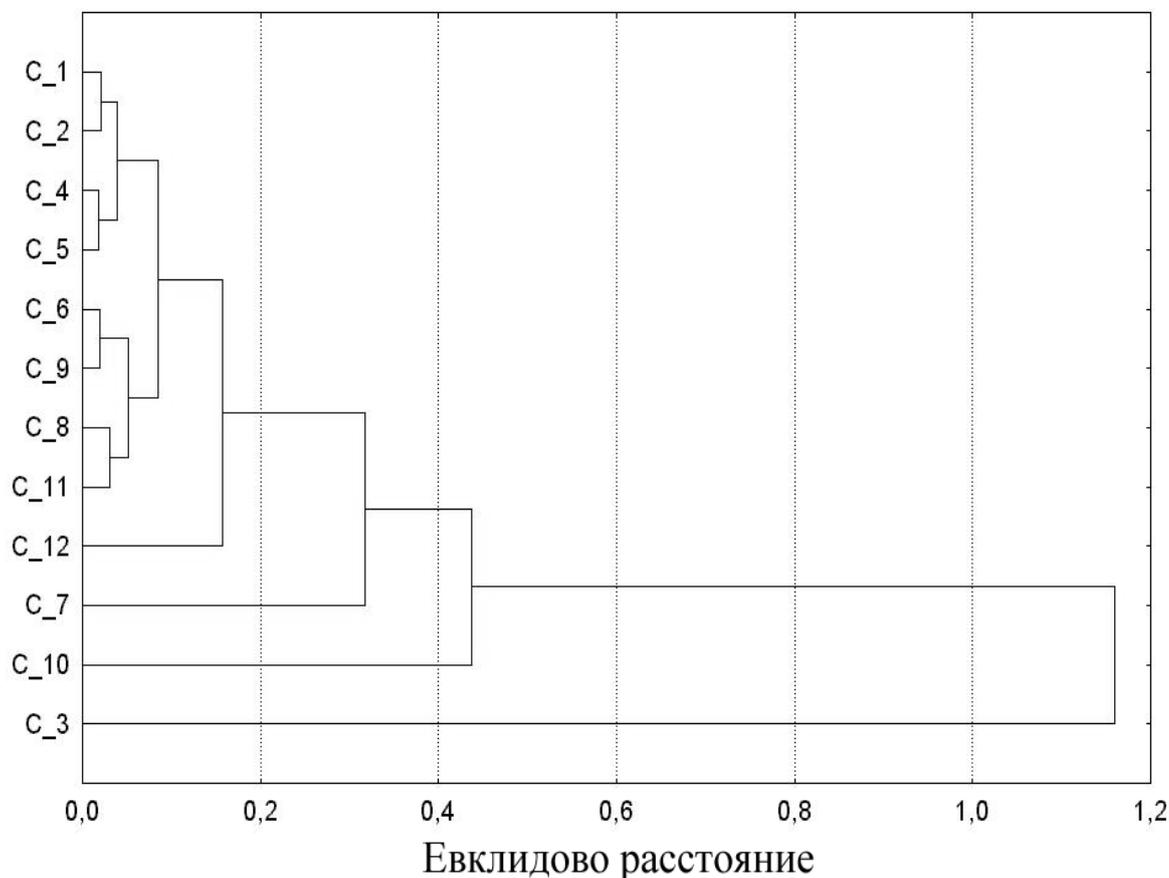


Рис. 5. Кластерный анализ пространственной неоднородности дрожжеподобных грибов и сапрофитных бактерий в районе исследований (номера станций – см. рис.1).

Первая группа включает в себя станции, не подверженные прямому воздействию сточных вод и расположенные выше сброса, а также правобережные станции, вторая группа - станции дельты – вход в Маймаксу (ст.9), Никольский рукав (ст.8), Кузнечиха (ст.11) и станцию в районе г. Архангельска. Станции, находящиеся в зоне влияния СВ АЦБК (ст.3, 7), СЦБК (ст.12) и в протоке Маймакса (ст.10), выделены в отдельные кластеры. Резко выделяется на фоне других станций район непосредственного влияния СВ АЦБК (ст.3), вносящий значительное микробиологическое загрязнение в экосистему реки.

Несмотря на относительно высокое содержание дрожжей в воде устьевой области по сравнению с чистыми районами, в данной концентрации они не конкурентноспособны с автохтонной микрофлорой и не способны повлиять на ее активность вследствие невысокого относительного обилия в гетеротрофном микробном сообществе. Доля дрожжеподобных грибов в карбофильном сообществе микроорганизмов в воде устьевой области

Северной Двины колеблется от 0.04 до 1.50%. На фоновой станции доля дрожжей составляет в среднем $0.28 \pm 0.04\%$. Наибольшие колебания относительного обилия дрожжей отмечены в протоке Маймакса и составляют от 0.15 % летом до 1.5% осенью. В отдельные периоды доля дрожжей в протоке Маймакса увеличивалась до 5.93% (июль 2002 г.). Увеличение относительного обилия дрожжей в гетеротрофном микробном сообществе свидетельствует о вторичных процессах, связанных с многолетним загрязнением.

Изучение вертикального распределения дрожжеподобных грибов в воде Северной Двины показало, что на фоновой станции их численность в поверхностном и придонном горизонтах отличается незначительно (табл.2). Другая закономерность наблюдается в районах, подверженных влиянию источников загрязнения.

Таблица 2

Вертикальное распределение дрожжеподобных грибов в устьевой области Северной Двины, тыс.КОЕ/л

Район исследований	Водные слои		
	поверхностный	придонный	придонный с наилком
Контроль	0.40	0.30	0.50
4 км выше сброса АЦБК	1.50	3.40	6.40
0.5 км ниже сброса АЦБК, левый берег	6.80	12.40	1180.00
4 км ниже сброса АЦБК, левый берег	5.30	4.00	6.00
35 км ниже сброса АЦБК	3.20	1.50	2.20
пр. Маймакса (п.Экономия)	20.50	29.40	78.60

В 4 км выше сброса (ст.2) численность ДГ в придонной воде увеличивается 2.3 раза, а в пробе воды, отобранной со взвесью соответственно в 4.3 раза. На этой станции сказывается влияние приливно-отливных течений, способствующих циркуляции аллохтонной микрофлоры сточных вод. В 0.5 км ниже выпуска СВ АЦБК (ст.3) в придонном горизонте также наблюдаются более высокие концентрации дрожжей. В придонных пробах с наилком и взвесью, концентрация дрожжей возрастает более, чем в 100 раз по сравнению с поверхностной водой и составляет более миллиона в литре. Причем все колонии, выросшие на питательной среде были одного морфологического типа, которые были отнесены к роду *Candida*. Увеличивается и относительное обилие дрожжеподобных грибов в гетеротрофном микробном сообществе до 3.58% в сравнении с поверхностной водой, что свидетельствует о накоплении их в донных

отложениях. В протоке Маймакса в поверхностном горизонте отмечены максимальные концентрации дрожжей по сравнению с другими станциями. В придонной воде их содержание увеличивается 1.4 раза, в придонной воде с наилком и взвесью - в 3.8 раза. Полученные результаты свидетельствуют, что грибы рода *Candida*, использовавшиеся в качестве продуцентов кормового белка, адаптировавшись к условиям окружающей среды, заняли экологическую нишу в сообществах микроорганизмов донных отложений, которые становятся источником постоянного поступления данных микроорганизмов в воду, что особенно выражено в приливно-отливной зоне. Очевидно, что дрожжеподобные грибы способствуют самоочищению донных отложений, что особенно важно в условиях угнетения планктонных и бентосных сообществ на участках, непосредственно примыкающих к источникам загрязнения.

Оценка изменений в экосистеме устьевой области Северной Двины, произошедших в связи с прекращением производства кормового белка, проведена на основании сравнения полученных нами в период 2000-2002 гг. результатов с данными о содержании грибов рода *Candida* в воде реки за 1978-1979 гг. (Влияние технических..., 1980) в период активного функционирования производств на Архангельском гидролизном заводе и АЦБК. Произошло снижение численности грибов рода *Candida* в воде реки в 4-13 раз, несмотря на постоянное поступления в реку (табл.3). Однако уменьшение содержания грибов связано не столько с элиминацией их из окружающей среды, сколько со снижением объема поступающих в реку сточных вод и концентрации данных микроорганизмов в стоках.

Таблица 3

Концентрация дрожжеподобных грибов рода *Candida* в воде устьевой области Северной Двины, $M \pm m$, тыс. КОЕ/л

Район исследований	1978-1979 гг.	2000-2002 гг.
4 км выше сброса	5.72 ± 1.80	$0.90 \pm 0.25^*$
18 км ниже сброса АЦБК, правый берег	3.98 ± 2.81	0.70 ± 0.10
18 км ниже сброса АЦБК, левый берег	55.95 ± 21.62	$4.53 \pm 0.52^*$
Пр. Кузнечиха	4.31 ± 1.75	1.17 ± 0.36

Примечание:

*- различия достоверны при 0.05 уровне значимости.

Исследование зависимости концентрации дрожжей в структуре гетеротрофной микрофлоры от гидрологического режима выявили горизонтальную и вертикальную неоднородность содержания гетеротрофных микроорганизмов (рис.6).

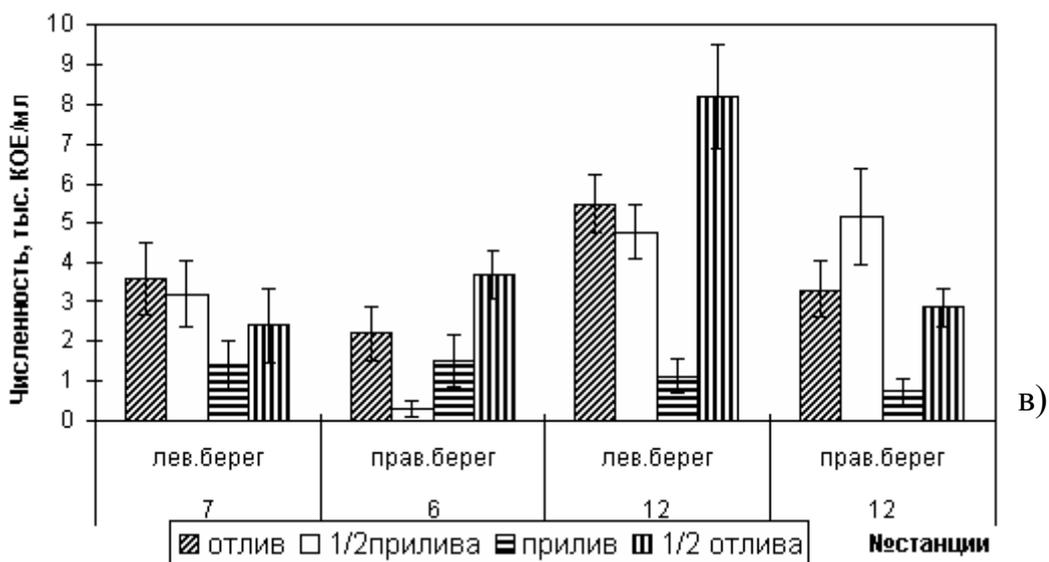
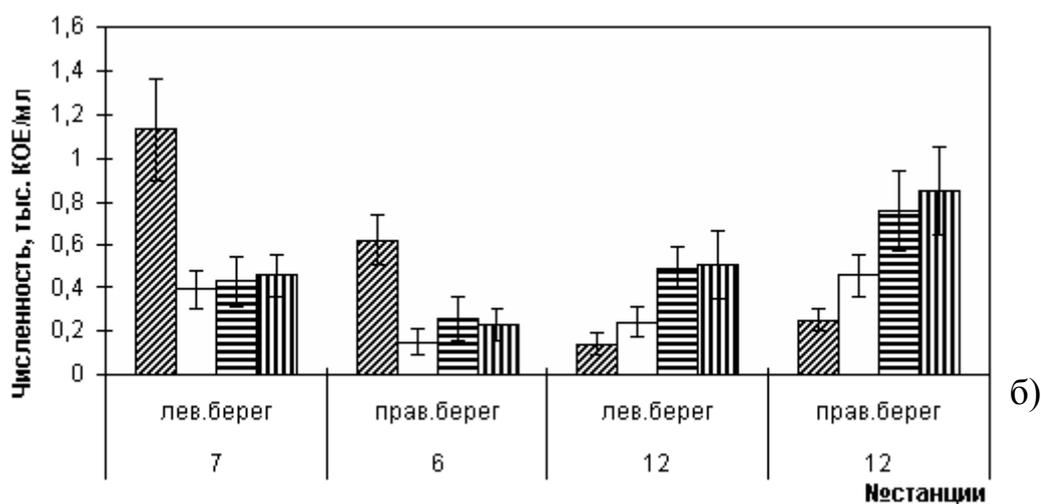
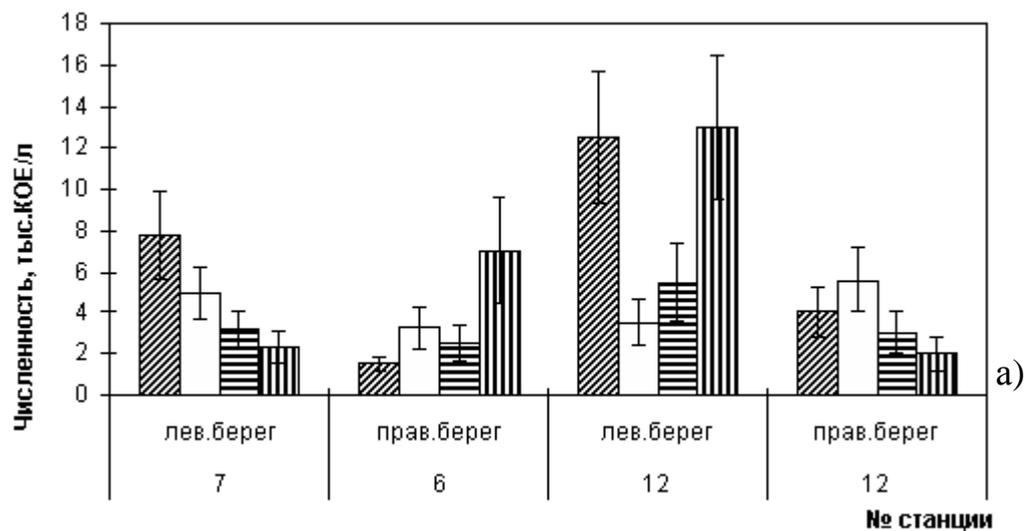


Рис. 6 Содержание ДГ в сравнении с сапрофитными бактериями в воде устья Северной Двины зависимости от гидрологического режима: а) ДГ, б) СБ (37°C), в) СБ (20°C).

В пробах воды, отобранных со станций, подверженных загрязнению промышленными сточными водами, отмечены значительные колебания численности микроорганизмов в различные фазы приливо-отливного цикла. При этом характер распределения определяемых показателей различался в зависимости от источника загрязнения и гидродинамики вод. В фазе отлива более сильное техногенное влияние испытывают левобережные биотопы из-за расположенных на левом берегу предприятий целлюлозно-бумажной промышленности (Архангельский и Соломбальский ЦБК). Во время смены направления приливных течений происходит перемешивание право- и левобережных вод (ст.6,7), вследствие чего правый берег Северной Двины испытывает влияние сточных вод АЦБК, правый берег протоки Кузнечиха (ст.12) – влияние стоков СЦБК. Колебания численности микроорганизмов в зависимости от фаз приливо-отливного цикла по-разному проявляются в поверхностном и придонном горизонтах. Поверхностные слои обогащаются аллохтонным органическим веществом и микроорганизмами с береговым стоком, а придонные воды испытывают сильное влияние донных отложений.

В результате высокой гидродинамической активности из донных отложений идет поступление органического вещества и микрофлоры в воду, о чем свидетельствуют повышенные показатели численности микроорганизмов в придонных слоях воды (рис.7).

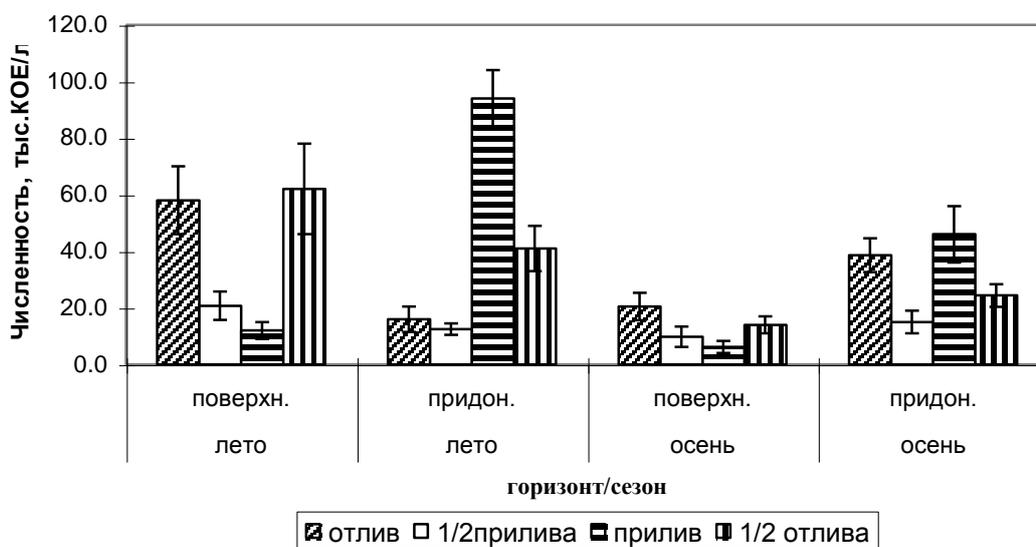


Рис. 7 Содержание дрожжеподобных грибов в воде пр. Маймакса (ст.10) в зависимости от гидрологического режима.

Высокие концентрации дрожжей в придонном горизонте протоки Маймакса, увеличение их концентраций во время прилива, обусловленное взмучиванием донных отложений водными массами, свидетельствует о вторичных процессах, связанных с многолетним микробиологическим загрязнением и, кроме того, со сложными гидродинамическими условиями.

Сезонные колебания численности дрожжеподобных грибов по-разному проявляются в различных точках отбора проб воды и зависят от источника загрязнения. В районах, не подверженных прямому влиянию стоков,

выявлена сходная сезонная динамика (рис.8). Максимумы концентраций микроорганизмов, как правило, приходятся на весну и осень. Наибольшие значения численности исследуемой микрофлоры приходятся на осенний период, когда за счет отмирания фито- и зоопланктона образуется легкодоступное органическое вещество. Весенний максимум микроорганизмов обусловлен, вероятно, поступлением с тальми водами аллохтонного органического вещества и микрофлоры. Другая закономерность наблюдается в районах, находящихся под интенсивным техногенным воздействием. Особенно четко сезонная динамика выражена в отношении дрожжеподобных грибов на станциях, расположенных в непосредственной близости от источника загрязнения (ст. 3, 10). Здесь отмечаются зимний и летний максимумы численности, связанные, вероятнее всего, с уменьшением стока реки в меженные периоды, и, соответственно, снижением степени разбавления сточных вод, а также с отсутствием консументов зимой и благоприятным температурным режимом летом.

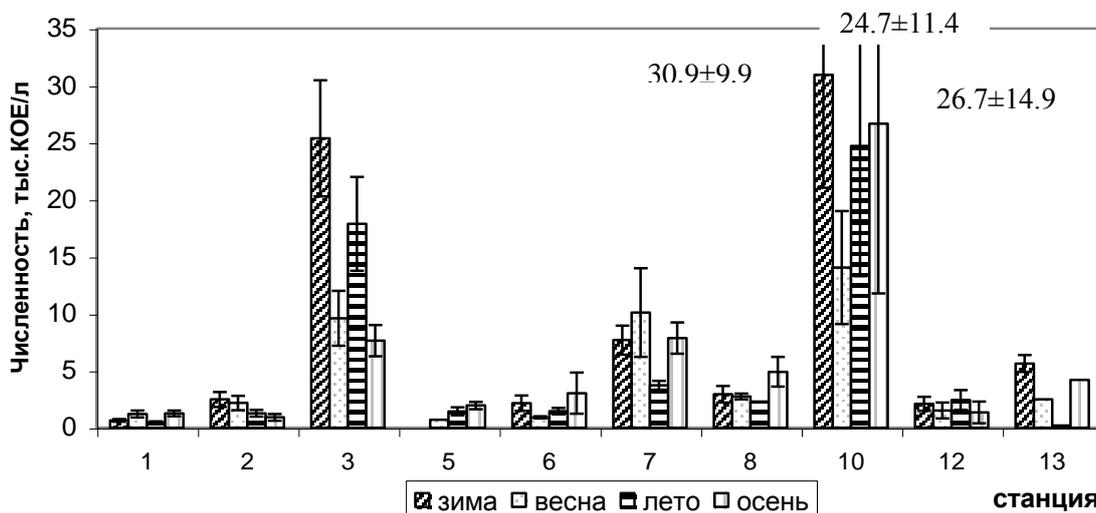


Рис. 8 Сезонная динамика численности дрожжеподобных грибов в устьевой области Северной Двины (средние данные за 2000-2002 гг.).

В серии опытов проведено изучение выживаемости грибов рода *Candida* в модельных водоемах с речной водой. Р.Ф. Хуснаризанова (1998) показала, что собственная сапрофитная микрофлора водоема не вступает в конкурентные взаимоотношения с аллохтонной микрофлорой сточных вод. Наши исследования также выявили, что относительное обилие дрожжеподобных грибов слишком мало, чтобы повлиять на состояние автохтонной микрофлоры водоема. Поэтому наш эксперимент проводился с намеренно завышенной концентрацией грибов (30.4 и 5.4 тыс. КОЕ/мл) с целью возможного прогноза поведения данных микроорганизмов в окружающей среде и влияния на собственную микрофлору водоема. Динамика отмирания популяции *Candida tropicalis* в модельных водоемах имела сходный характер: некоторое увеличение численности к 5 дню наблюдений, затем резкое снижение к 8 дню инкубации в обоих водоемах.

Далее в течение месяца происходит медленное отмирание грибов, однако концентрация дрожжей в водоеме с меньшей дозой интродукции была в 11.5-13.6 раз выше. В последующий период наблюдения проявилась тенденция к стабилизации численности дрожжей и через 4 месяца их концентрация в аквариумах приблизилась к наблюдаемым в реке. Можно предположить, что стабилизация численности связана не только с простым переживанием дрожжей, но и динамическим равновесием процессов размножения и гибели, что свидетельствует о приспособленности данной популяции к обитанию в речной воде.

Изучение концентраций собственной микрофлоры водоема в модельных водоемах показало, что в природной воде в изменении содержания сапрофитной микрофлоры в контрольном аквариуме и в аквариуме с внесенными дрожжами выявлена сходная динамика. Однако в водоеме с дрожжами численность сапрофитных бактерий была достоверно ниже, чем в контроле ($p \leq 0.05-0.001$). Внесение дрожжеподобных грибов в концентрации, превышающей численность сапрофитных бактерий в 2 раза, привело к угнетению развития эвтрофного бактериоценоза и снижению численности в среднем на 38.4% по сравнению с контролем.

Изучены корреляционные зависимости содержания дрожжеподобных грибов с абиотическими и биотическими факторами среды. Установлено, что взаимосвязи между содержанием дрожжей и факторами среды различны для условно чистых, загрязненных и расположенных в дельте реки станций. Согласно полученным данным, из всех учитываемых факторов наиболее значимым для дрожжей является содержание азота. На условно чистых станциях отмечена отрицательная корреляция с нитритным ($r = -0.587$, $p \leq 0.05$) и нитратным азотом ($r = -0.518$, $p \leq 0.05$), на загрязненных станциях - положительная с аммонийным азотом ($r = 0.605$, $p \leq 0.01$), в дельте реки - с нитратным азотом ($r = -0.621$, $p \leq 0.001$). Значимая положительная связь выявлена с аллохтонными бактериями ($r = 0.614$, $p \leq 0.001$), что свидетельствует об общности факторов, обуславливающих их развитие. Отрицательная - с факультативными олиготрофными бактериями на чистых станциях ($r = -0.572$, $p \leq 0.05$), а в районе влияния сточных вод - прямая взаимосвязь со всеми эколого-трофическими группами бактерий ($r = 0.493-0.535$, $p \leq 0.001$). Достоверных взаимосвязей с температурой, pH, минерализацией, содержанием кислорода не выявлено.

Глава 6. Таксономическая структура и биоразнообразие дрожжеподобных грибов в воде устьевой области Северной Двины в условиях микробиологического загрязнения

Для изучения влияния микробиологического загрязнения на состояние природных комплексов дрожжеподобных грибов нами была определена таксономическая структура дрожжеподобных грибов в биотопах с различной степенью антропогенного воздействия.

На фоновой станции преобладающими оказались пигментированные дрожжи, не сбраживающие сахара и не образующие мицелий - *Rhodotorula*,

относительное обилие которых в среднем составило 47.6%. Грибы родов *Candida*, *Trichosporon* не были обнаружены ни в одной из проб воды, отобранных на фоновой станции.

В воде загрязненных районов устьевой области Северной Двины доминировали грибы рода *Candida* (рис.9): вблизи АЦБК доля их составила в среднем 74.2%. Выделены также дрожжи рода *Trichosporon*, которые наряду с *Candida* входили в ассоциацию продуцентов белка. В протоках дельты - Маймаксе, на которой расположен гидролизный завод, и Кузнечихе, находящейся под влиянием сточных вод Соломбальского ЦБК, также доминантами оказались грибы рода *Candida* (56.2% и 45.5% соответственно), хотя доля их меньше, чем вблизи АЦБК. В дельте реки сказывается комплексное влияние внешних факторов, в том числе и терригенного стока и сложного гидрологического режима.

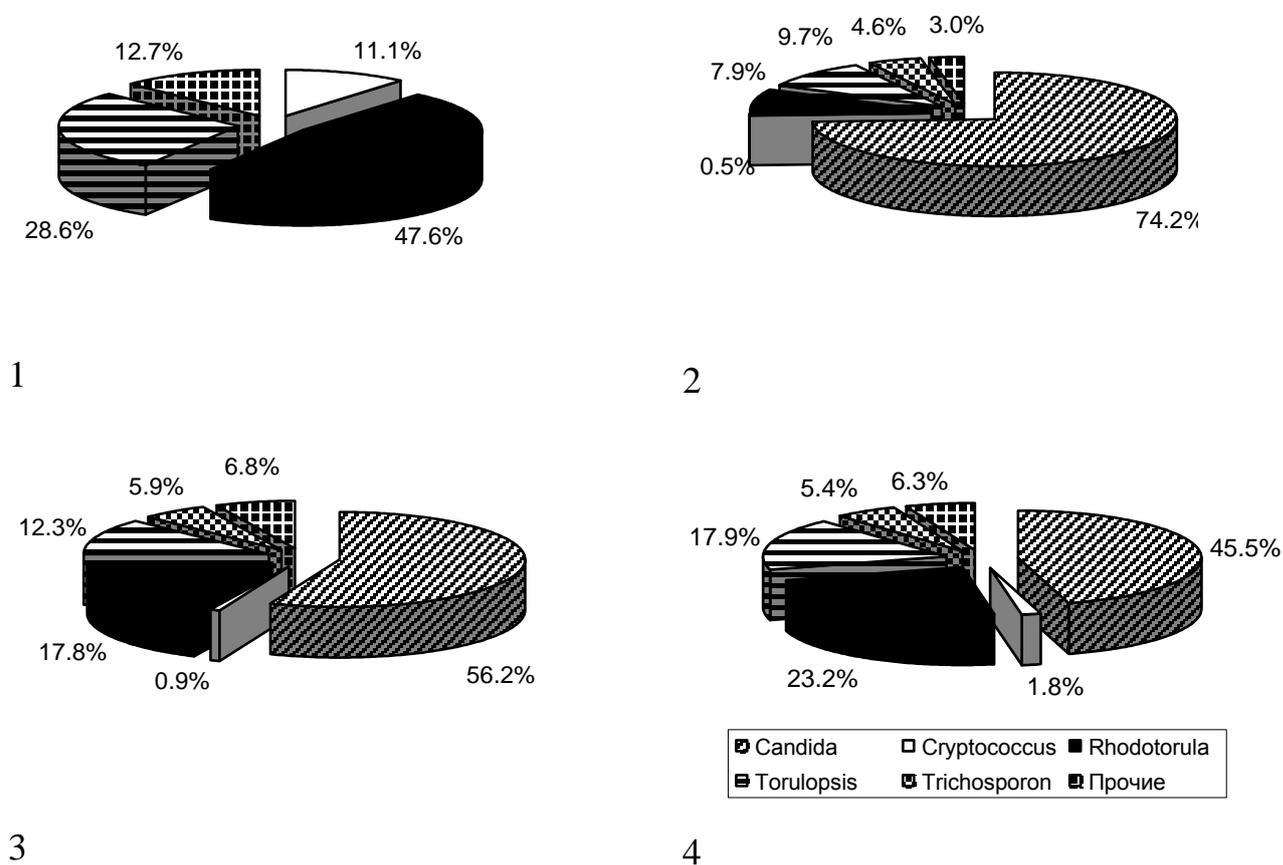


Рис.9 Структура дрожжеподобных грибов воды устьевой области Северной Двины: 1 - контроль, 2 - 0,5 км ниже по течению от выброса сточных вод АЦБК, 3 - пр. Маймакса, 4 - пр. Кузнечиха

Анализ сезонного изменения таксономической структуры дрожжей позволил выявить общую закономерность для микробиологически загрязненных районов (ст.3, ст.10) – уменьшение относительного обилия

грибов рода *Candida* в весенний период, хотя по гидродинамическим условиям эти районы различаются. Так, на ст.3 доля *Candida* весной достигла своего минимального значения 55.3%, на ст.10 – 52.5%, сохраняя свое доминирующее положение. Снижение доли *Candida* обусловлено, вероятно, увеличением степени разбавления вод, перемешивания, поступления с болотными водами и поверхностным смывом дрожжеподобных грибов. В летне-осенний период относительное обилие доминирующих дрожжей рода *Candida* увеличивается – вблизи АЦБК до 70.8% - 71.6%, в пр.Маймакса до 63.8% летом.

Таким образом, вследствие многолетнего загрязнения экосистемы устьевой области реки Северная Двина сточными водами, содержащими дрожжеподобные грибы, использовавшихся в качестве продуцентов кормового белка, произошла перестройка в структуре природных комплексов дрожжевой микрофлоры, которая проявилась в смене доминантов и изменении относительного обилия различных групп дрожжей. Дрожжевые сообщества района влияния АЦБК (ст.3) характеризовались более низким уровнем биоразнообразия и выравненности ($H=1.07$, $J=0.55$) по сравнению с фоновой станцией ($H=1.29$, $J=0.94$). Большим разнообразием отличались сообщества дрожжеподобных грибов районов с умеренным антропогенным влиянием. Это связано с поступлением дрожжевой микрофлоры и питательных субстратов со сточными водами и с терригенным потоком. Так, наиболее разнообразными были дрожжевые сообщества пр. Кузнечихи ($H=1.58$, $J=0.88$).

Поступление дрожжеподобных грибов в экосистему устья Северной Двины не привело к необратимому изменению структуры естественного бактериоценоза данного района. Несмотря на относительно высокое содержание дрожжей в воде реки по сравнению с фоном, в данной концентрации они не конкурентоспособны по сравнению с автохтонной микрофлорой и не способны повлиять на ее активность вследствие невысокого относительного обилия в гетеротрофном микробном сообществе. Повышенные концентрации дрожжей, изменение таксономической структуры и естественных процессов развития нативной микрофлоры ограничено локальными зонами влияния источников загрязнения. Вместе с тем, локальные изменения состояния экосистем, не представляющие видимой опасности, накапливаясь, могут привести к кризисной ситуации - скачкообразному переходу в иное стационарное состояние. Исследования содержания промышленных штаммов микроорганизмов должны стать неотъемлемой частью экологического мониторинга водных экосистем, подвергающихся микробиологическому загрязнению.

Выводы

1. Устьевая область р.Северная Двина характеризуется повышенными концентрациями (до 60.0 тыс.КОЕ/л) дрожжеподобных грибов. Максимальные концентрации наблюдаются в районах промышленного микробиологического загрязнения.

2. Выделение дрожжеподобных грибов в стоках ЦБК продолжается до 7 лет после прекращения производства кормового белка; доминирование грибов рода *Candida* в сточных водах свидетельствует о сохранении жизнедеятельности промышленных штаммов на очистных сооружениях.
3. Грибы рода *Candida* сохраняются в донных отложениях реки в течение 7 лет после прекращения производства кормовых дрожжей; поддержание их жизнедеятельности обусловлено поступлением дрожжеподобных грибов и органических веществ со сточными водами.
4. Определяющими факторами, влияющими на количественный и качественный состав дрожжеподобных грибов, являются сточные воды ЦБК и гидродинамические особенности приливного участка реки, способствующие поступлению дрожжей из донных отложений в водные слои.
5. В районах, подверженных интенсивному техногенному воздействию, сезонная динамика численности дрожжей нарушается локально, что выражается в увеличении их концентрации в летнюю и зимнюю межень на участках влияния источников загрязнения.
6. Продолжительное, в течение 30 лет, загрязнение экосистемы устья реки сточными водами, содержащими дрожжеподобные грибы, вызвало изменение структуры природных комплексов дрожжевой микрофлоры: доминирующими в загрязненных районах являются грибы рода *Candida*, в чистых – *Rhodotorula* и *Torulopsis*.
7. Дрожжеподобные грибы не оказывают существенного влияния на состояние естественного гетеротрофного бактериоценоза Северной Двины вследствие незначительного относительного обилия в гетеротрофном сообществе воды (0.05-1.5%).
8. Установлена отрицательная корреляция концентрации дрожжеподобных грибов в воде с содержанием нитритного ($r=-0.587$, $p\leq 0.05$) и нитратного азота ($r=-0.518$, $p\leq 0.05$).
9. Популяция *Candida tropicalis* выживает в течение 4-х месяцев в модельных водоемах с речной водой. Внесение дрожжеподобных грибов в модельный водоем в концентрации, превышающей численность сапрофитных бактерий в 2 раза, приводит к угнетению развития эвтрофного бактериоценоза и снижению концентрации бактерий в среднем на 38.4% по сравнению с контролем.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Забелина С.А Микробиологическая индикация загрязнений р. Северной Двины в районе Архангельского ЦБК / Забелина С.А., Воробьева Т.Я. // Экология -98: Тез. докл. Архангельск: ИЭПС УрО РАН, 1998. С. 76-77.
2. Забелина С.А Микробиологические исследования р. Северной Двины в июле 1998 года / Воробьева Т.Я., Забелина С.А. // Матер. межд. конф «Геодинамика и геоэкология». Архангельск: ИЭПС УрО РАН, 1999. С.58-59.

3. Забелина С.А. Результаты микробиологического исследования реки Северной Двины в июле 1998 года / Кузнецов В.С., Забелина С.А., Воробьева Т.Я. // Сб.статей. «Экология Северной Двины». Архангельск, 1999. С.137-142.
4. Забелина С.А. Состояние планктонных сообществ устьевой области реки Северной Двины в зоне влияния Архангельского ЦБК / Забелина С.А., Тарасова Н.А., Воробьева Т.Я. и др. // Поморье в Баренц- регионе на рубеже веков: экология, экономика, культура: Тез. докл. Архангельск: ИЭПС УрО РАН, 2000. С. 82.
5. Забелина С.А. Распространение дрожжеподобных грибов в устьевой части р. Северной Двины // Матер. межд. конф. «Экология северных территорий России. Проблемы, прогноз ситуации, пути развития, решения». Архангельск: ИЭПС УрО РАН, 2002. Т.2. С. 361-365.
6. Забелина С.А. Динамика и структура дрожжеподобных грибов воды устьевой области Северной Двины // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера: Тез. докл. III (XXXVI) межд. конф. Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН, 2003. С. 34-35.
7. Забелина С.А. Аллохтонная микрофлора в зоне влияния Архангельского и Соломбальского ЦБК / Воробьева Т.Я., Забелина С.А. // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера: Тез. докл. III (XXXVI) межд. конф. Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН, 2003. С. 20.
8. Забелина С.А. Реакция гидробионтов различного трофического уровня экосистемы устьевой области реки Северной Двины на сточные воды Архангельского ЦБК / Воробьева Т.Я., Собко Е.И., Забелина С.А. и др. // Матер. всеросс. конф.: «Стратегия развития северных регионов России». 18-19 ноября, 2003 г. Архангельск: Арх.филиал ИЭ УрО РАН, 2003. С.278-281.
9. Забелина С.А. Структура дрожжеподобных грибов устьевой области Северной Двины под влиянием биологического загрязнения / Забелина С.А., Добродеева Л.К. // Экология человека / Приложение. Матер. всеросс. конф. с межд. участием «Биологические аспекты экологии человека». №4. Т.1. С.183-185. Архангельск: СГМУ, 2004.