

**РОЛЬ ПРОСТЕЙШИХ В ПРОЦЕССАХ МИГРАЦИИ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ
НЕФТЯНЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ В ЭКОСИСТЕМЕ Р. АМУР**

Е.А. Каретникова, А.Д. Жиркова

*Институт водных и экологических проблем ДВО РАН, ул. Ким-Ю-Чена, 65,
Хабаровск 680000 Россия. E-mail micro@ivep.as.khb.ru*

В работе представлены данные о динамике численности и морфометрических показателях *P. caudatum* при использовании в качестве пищевого ресурса биомассы углеводородокисляющих бактерий, культивированных на различных источниках углерода. Показано, что при выедании бактерий, утилизовавших дизельное топливо, в клетках простейших накапливались алканы. Накопление углеводородов связано не только с миграцией углеводородов в системе «нефтепродукт–бактерии–инфузории», но и с синтезом внутриклеточных алканов. Дегградация дизельного топлива в условиях лимитирования по азоту или фосфору протекает более эффективно в результате деятельности сообщества бактерий и инфузорий, чем чистой культуры углеводородокисляющих бактерий.

**ROLE OF INFUSORIA IN PROCESSES OF MIGRATION
AND MICROBIOLOGICAL TRANSFORMATION
OF OIL HYDROCARBONS IN THE AMUR RIVER ECOSYSTEM**

E.A. Karetnikova, A.D. Zhirkova

*Institute of Aquatic and Ecological Problems, Russian Academy of Sciences, Far East Branch,
Kim-Yu-Chen St., 65, Khabarovsk 680000, Russia, E-mail micro@ivep.as.khb.ru*

In this paper there are produced data on dynamics of the *P. caudatum* number and morphometrical indices using hydrocarbon-reducing bacteria cultivated in various carbon sources as a food resource. It is shown that when eating away bacteria utilized diesel fuel alkanes are accumulated in the cells of protozoa. The accumulation of hydrocarbons is connected not only with the migration of hydrocarbons in a system «oil product–bacteria–infusoria» but also with the synthesis of inner-cellular alkanes. Degradation of diesel fuel occurs more effectively in the conditions of limiting nitrogen or phosphorus as a result of bacterium and infusorian communities activity as compared with a pure culture of hydrocarbon-reducing bacteria.

Введение

Нефтяные углеводороды (НУ) – одни из наиболее распространенных поллютантов водных экосистем. Поступая в водоемы, углеводороды подвергаются физико-химической и биологической трансформации. В природных условиях важную роль в деградации загрязняющих веществ играют не только кинетические характеристики отдельных штаммов-деструкторов и их ферментативная активность, но и взаимодействие элементов внутри сообщества «первичных деструкторов» (Гуревич и др., 1995). Так, основными агентами, осуществляющими разложение НУ в различных условиях, являются бактерии и микровицеты (Квасников, Клюшникова, 1981; Суровцева и др., 1997; Звягинцева и др.,

2001). В свою очередь, нарастающая бактериальная биомасса активно выедается простейшими. Так, при изучении влияния выбросов нефтяного терминала на цилиоценоз косы Чушка в восточной части Азовского моря было отмечено, что поступление нефтепродуктов приводит к гибели и инцистированию простейших, а по мере разбавления выбросов и их трансформации нефтеокисляющими бактериями начинается бурное развитие инфузорий (Кренева, 2002). На примере экосистемы Рыбинского водохранилища показано, что в течение вегетационного периода величина выедания бактерий простейшими (флагеллятами и инфузориями) в бактериальной продукции может достигать 138 %, т. е. происходит потребление не только бактериальной продукции, но и наличной биомассы бактерий (Копылов и др., 2003).

Утилизация биомассы бактерий способствует рециклингу биогенных элементов и интенсификации процессов очищения водных экосистем. Известно, что инфузории стимулируют обновление бактериальной массы и поддерживают ее высокую биологическую активность (Watson, 1945). В то же время в процессе микробиологического разрушения углеводов поступают внутрь бактериальных клеток (Коронелли, 1980). Вероятно, несмотря на протекающие в бактериальных клетках процессы трансформации НУ, часть углеводов может попадать в организм животных вышестоящего трофического уровня.

Целью работы было изучение динамики численности клеток инфузорий *Paramecium caudatum*, изменения их морфометрических показателей и состава внутриклеточных алканов при совместном культивировании с углеводородокисляющими бактериями, а также исследование темпов деградации НУ чистой культурой бактерий и сообществом бактерий и простейших при различной концентрации биогенов.

Объекты и методы

В экспериментах использовали культуру инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1838 (класс Oligohymenophora, отряд Hymenostomatida). Среди пресноводных инфузорий одними из резистентных к воздействию НУ являются именно *Paramecium caudatum* (Жиркова, 2004).

При изучении динамики роста цилиат в качестве корма в среду одновременно вносили суспензию клеток природного изолята углеводородокисляющих бактерий X-1. Данный штамм выделен из воды р. Амур методом накопительной культуры.

Для культивирования бактерий использовали следующие среды: разбавленный рыбопептонный агар (РПА:10); среда Раймонда с дизельным топливом, нанесенным на поверхность агара, среда Раймонда с парами топлива (Кузнецов, Дубинина, 1989).

Для выращивания бактерий в парах дизельного топлива в агаровой пластине вырезали блок и вставляли поролоновую пробку, пропитанную нефтепродуктом (Эрнестова, 1981). Оптическая плотность (D 490) бактериальной суспензии 1,5 (при выращивании на среде Раймонда) и 0,75 усл. ед. (при выращивании на среде РПА:10).

Инфузорий культивировали в чашках Петри, куда вносили 20 мл маточной культуры и 1 мл суспензии клеток бактерий. Морфометрические показатели цилиат измеряли с помощью окуляр-микрометра на микроскопе МИКМЕД-1.

Для анализа качественного состава алканов в клетках инфузорий выращивали в колбах объемом 250 мл, содержащих 100 мл среды Лозина-Лозинского. В качестве корма вносили по 1 мл суспензии 4-суточной культуры углеводородокисляющих бактерий X-1. Кормление проводили 1 раз в неделю. Для анализа качественного состава углеводов клетки инфузорий отделяли фильтрованием через бумажный фильтр «зеленая лента». Анализ проводили при плотности популяций около 100 кл/мл.

Биомассу растирали со стеклом, углеводороды экстрагировали гексаном. Полученный экстракт очищали методом тонкослойной хроматографии, *n*-алканы элюировали с пластин гексаном.

Для изучения процесса утилизации дизельного топлива использовали штамм бактерий *Bacillus* sp. Пдт-1, выделенный из воды р. Амур методом накопительной культуры. Культивирование чистой культуры бактерий и сообщества бактерий и инфузорий проводили в колбах объемом 100 мл, содержащих 50 мл среды Раймонда. В экспериментах использовали полную среду Раймонда, среду со сниженной концентрацией $P_{\text{мин}}$ и $N_{\text{мин}}$ (10 и 50 %) и среду, не содержащую азота или фосфора.

Образующиеся при развитии инфузорий, а также сообщества инфузорий и бактерий в среде с дизельным топливом глобулы отделяли от среды на бумажном фильтре (синяя лента) и промывали дисцилированной водой. Затем проводили экстракцию органических веществ хлороформом, удаляли растворитель и растворяли сухой остаток в гексане.

Состав углеводов анализировали на газо-жидкостном хроматографе HP-5890 серия II (США).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием формул (Плохинский, 1970; Количественные методы..., 1987).

Результаты и обсуждение

Влияние дизельного топлива на динамику развития популяции *Paramecium caudatum*. Ранее было отмечено, что для простейших дизельное топливо токсичнее нефти. В присутствии данного нефтепродукта в первые 1-6 ч проявлялось явление инверсии токсичности, когда с уменьшением концентрации токсичность для организмов увеличивается (Жиркова, 2005).

При исследовании влияния дизельного топлива на динамику развития популяции парамеций было отмечено падение численности в период от 24 до 168 ч. Это связано не только с воздействием токсиканта, но и с переносом цилиат в новую среду. Токсикологический эффект дизельного топлива на популяцию инфузорий *P. caudatum* в этот период отчетливо проявлялся при концентрации нефтепродукта 0,005 мл/л, что выражалось в снижении числа клеток в 10 раз по сравнению с исходной численностью цилиат; в то время как в контроле численность уменьшилась только в 3,75 раза. В дальнейшем в присутствии токсиканта число клеток увеличивалось незначительно (рис. 1). Вероятно, это связано с проникновением углеводов в клетки и нарушением репродуктивных функций.

Динамика численности *Paramecium caudatum* при выедании углеводородокисляющих бактерий. Изучение динамики развития инфузорий при внесении в среду углеводородокисляющих бактерий (штамм X-1) показало, что данный пищевой ресурс ак-

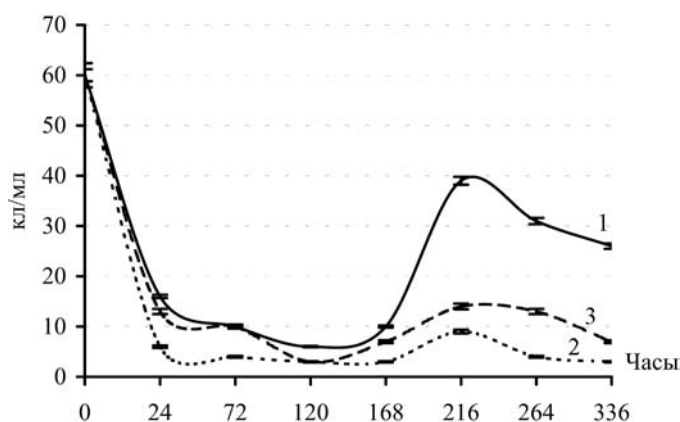


Рис. 1. Динамика численности *P. caudatum* при воздействии дизельного топлива. 1 — контроль, 2 — в присутствии 0,005 мл/л топлива, 3 — в присутствии 0,0005 мл/л топлива

тивно использовался цилиатами. Однако при использовании в качестве корма бактерий, культивировавшихся на среде РПА:10, численность *P. caudatum* превышала этот показатель для популяции цилиат, выедавших бактерий, утилизовавших жидкие и летучие углеводороды дизельного топлива (рис. 2).

Кроме динамики численности инфузорий *P. caudatum* во время эксперимента учитывали морфометрические показатели (длина и ширина клетки, их соотношение, диаметр пищеварительной вакуоли).

Полученные данные показали, что при кормлении *P. caudatum* бактериями со всех используемых в эксперименте сред происходило измельчение клеток по сравнению с клетками маточной культуры (таблица). Вероятно, это явление связано с интенсивным делением клеток, происходящим в результате наличия избыточного кормового ресурса.

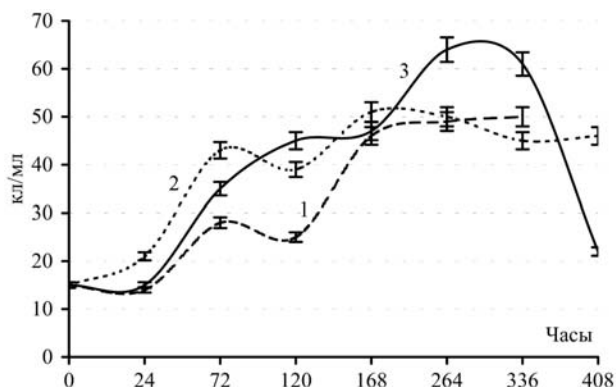


Рис. 2. Динамика численности *P. caudatum* при скормливании бактерий со среды Раймонда с дизельным топливом (1), парами топлива (2) и РПА:10 (3)

Морфометрические показатели *Paramecium caudatum* при выедании бактерий, культивировавшихся на различных средах (336 ч)

Показатель	Среда		
	Контроль (среда Лозина-Лозинского)	РПА:10	Среда Раймонда/пары ДТ
Длина клетки, мкм	152,1±0,9	131,6±0,39	102,2±0,23
Ширина клетки, мкм	50,7±,78	37,1±0,76	30,1±0,4
Соотношение длины и ширины	3:1	3,5:1	3,4:1
Диаметр пищ. вакуоли, мкм	5,61±0,98	4,76±0,57	6,53±0,2
Соотношение длины клетки и диаметра вакуоли	27,1:1	27,6:1	15,7:1

В случае с пищеварительными вакуолями наблюдалось следующее: при питании бактериями, выращенными на среде РПА:10, диаметр вакуоли уменьшался в 1,18 раза. Однако нужно принимать во внимание уменьшение размеров клеток цилиат. Для этого введен такой показатель, как соотношение длины клетки к диаметру вакуоли. Данный коэффициент был одинаковым для цилиат маточной и опытной культуры (питавшихся бактериями со среды РПА:10). Уменьшение этого показателя свидетельствует об увеличении пищеварительной вакуоли по отношению к размерам клетки и, следовательно, об интенсивном питании простейших.

То есть при скормливании углеводородокисляющих бактерий цилиаты используют данный кормовый ресурс. Влияние условий культивирования бактерий (источник углевода), используемых в качестве пищи, на динамику роста простейших проявлялось в изменении характера кривых численности *P. caudatum*.

Состав углеводов в клетках бактерий и инфузорий. В результате анализа состава внутриклеточных углеводов было отмечено, что в клетках маточной культуры *P. caudatum* содержится широкий спектр *n*-алканов с длиной цепи C₁₂–C₃₀, однако их содержание низкое (рис. 3). Анализ, проведенный через 14 сут культивирования инфузорий с углеводородокисляющими бактериями, показал значительное изменение спектра *n*-алканов и увеличение содержания отдельных соединений. Это связано с внесением

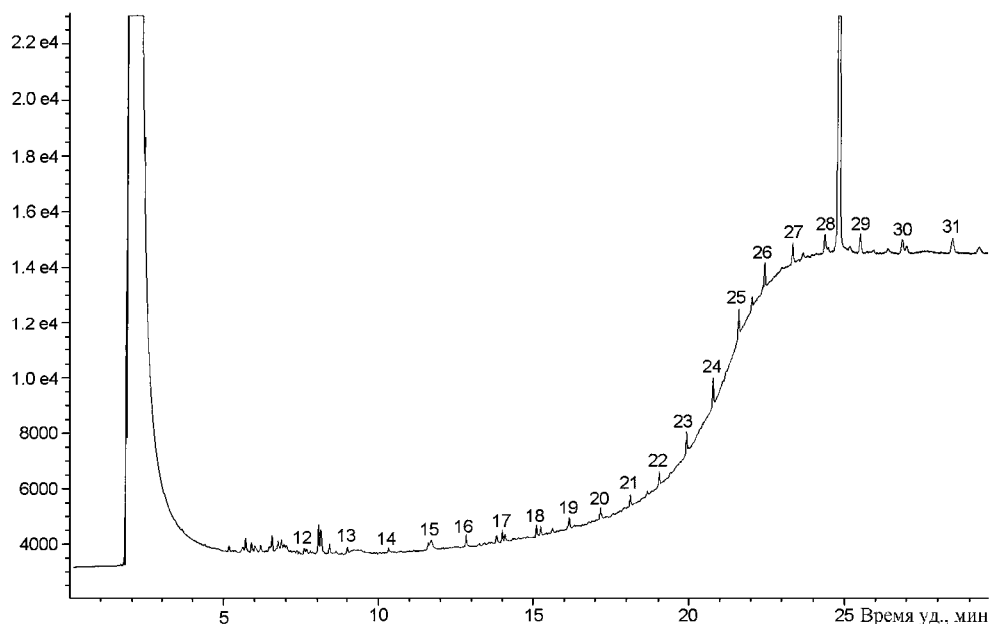


Рис. 3. Хроматограмма углеводородов, полученная при анализе маточной культуры *P. caudatum*

большого количества кормового ресурса. При скормливания бактерий, выращенных на среде Раймонда в биомассе цилиат, отмечалось большое качественное разнообразие углеводородов. В клетках *P. caudatum*, выедавших бактерии, утилизовавших жидкие углеводороды, были обнаружены алканы с длиной цепи C_{12} – C_{20} (рис. 4), а при питании бактериями, утилизовавшими летучие углеводороды, – алканы с длиной цепи C_{16} – C_{24} .

Количественное и качественное содержание углеводородов в клетках простейших не повторяло картину распределения пиков алканов на хроматограммах, полученных при анализе бактериальной биомассы (рис. 5). Это может объясняться синтезом внутриклеточных алканов инфузориями, а также трансформацией углеводородов бактериями после захвата инфузориями до момента их гибели в пищеварительных вакуолях простейших.

Анализ возможности миграции углеводородов по трофической цепи от бактерий к простейшим показал следующее: при непосредственном контакте бактерий с дизельным топливом и в дальнейшем с инфузориями в клетки последних мигрируют и накапливаются алканы с длиной цепи C_{15-19} и $C_{21, 22}$ и C_{24} . При росте бактерий в присутствии летучих углеводородов – C_{16} , C_{19} , C_{21} , алканы с длиной цепи C_{17-18} в этом случае накапливались малоинтенсивно.

Утилизация дизельного топлива углеводородокисляющими бактериями и сообществом инфузорий и бактерий. Для исследования влияния инфузорий на процесс микробиологической утилизации топлива был использован штамм *Vacillus* sp. Пдт-1. Бактерии данного штамма утилизировали широкий спектр алканов. Изучение динамики численности *P. caudatum* при выращивании в полноценной среде Раймонда показало, что инфузории активно используют в качестве пищевого ресурса углеводородокисляющих бактерий данного штамма. Период адаптации к внесённому бактериальному корму составлял 120 ч, после этого отмечалось значительное увеличение численности цилиат. Внесение 0,1 % дизельного топлива при одновременном культивировании цилиат и бактерий не приводило к значительному изменению численности и динамики развития популяции *P. caudatum* (рис. 6). Это связано с утилизацией углеводородов бактериями.

В природных условиях биологические процессы протекают в условиях несбалансированных, характеризующихся избытком либо недостатком биогенных элементов. Концентрация последних может играть значительную роль в процессах биологической очистки загрязнённых вод. Так, ранее было отмечено увеличение эффективности дегра-

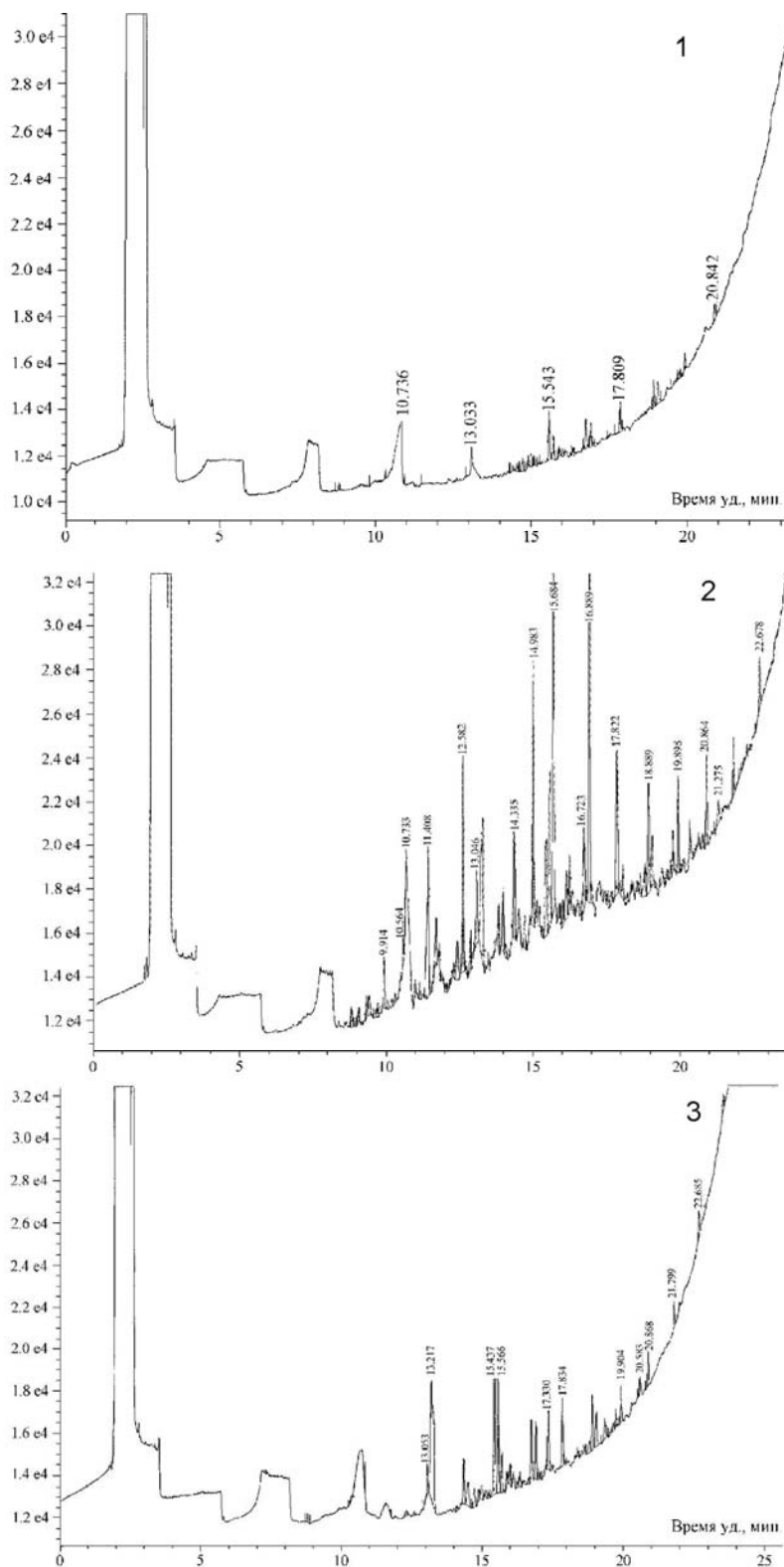


Рис. 4. Хроматограммы углеводородов, полученных при анализе биомассы инфузорий, выедавших бактерий со среды РПА:10 (1), Раймонда с топливом, нанесенным на агаровую пластину (2) и парами топлива (3)

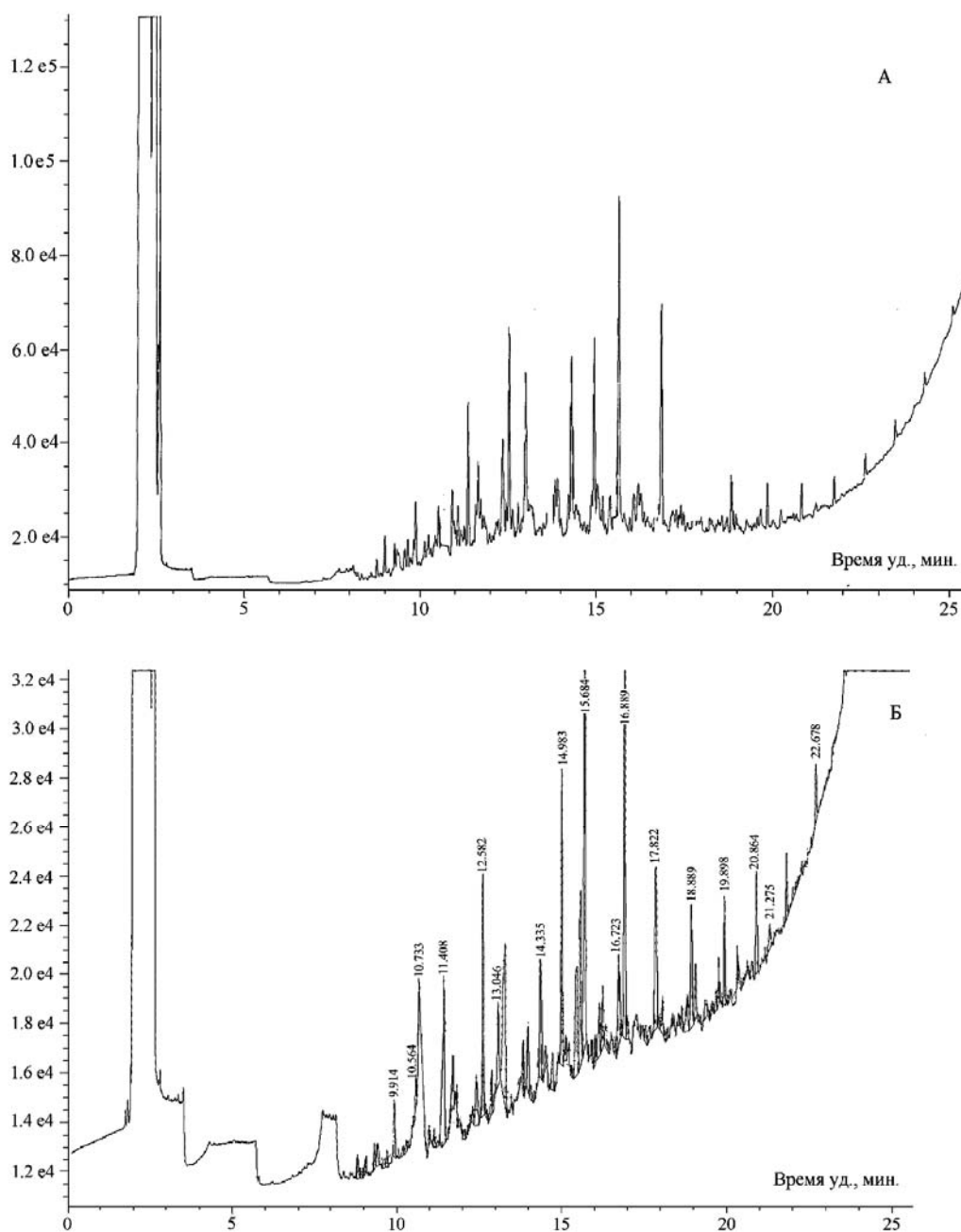


Рис. 5. Состав углеводов в биомассе бактерий, культивировавшихся на среде Раймонда с дизельным топливом (А) и инфузорий *P. caudatum* (Б)

дации фенола сообществом «бактерии–простейшие» при уменьшенном потоке фосфора (Гуревич и др., 1995).

При развитии сообщества протозоа и бактерий в условиях дефицита и полного отсутствия минеральных форм азота или фосфора в среде не произошло снижения численности цилиат. Резкое увеличение численности отмечалось через 168 ч (рис. 7). Значительного различия в численности инфузорий в зависимости от концентрации биогенов в среде не было отмечено.

Анализ содержания дизельного топлива через 10 сут показал, что при развитии чистой культуры *Bacillus* sp. Пдт-1 и сообщества протозоа и бактерий на полноценной среде Раймонда убыль топлива составила 58–60 %. При отсутствии фосфора в среде количество дизельного топлива, утилизированного чистой культурой бактерий, увеличивалась на 12 % по сравнению с вариантом, где бактерии культивировались на полной минеральной среде. Введение в систему инфу-

зорий в данном случае не приводило к увеличению темпов утилизации топлива по сравнению с чистой культурой бактерий. При содержании фосфора в среде 10 % бактерий убыль топлива незначительно увеличивалась по сравнению с полноценной средой. А при развитии сообщества протозоа и бактерий в условиях дефицита фосфора убыль топлива увеличивалась на 14 % по сравнению с сообществом, развивавшемся на полной среде. При 50 % содержании фосфора чистая культура бактерий утилизировала 53 % топлива, а сообщество – 82 %. То есть при культивировании сообщества протозоа и бактерий в условиях дефицита фосфора утилизация топлива протекала быстрее, чем на полноценной среде. Особенно при содержании $P_{мин}$ 50 %. Это связано с выеданием бактерий инфузориями и возвращением фосфора в среду. Кроме того, активные процессы выедания способствуют обновлению бактериальной массы и поддержанию ферментативной активности на высоком уровне. Можно предположить, что именно концентрация фос-

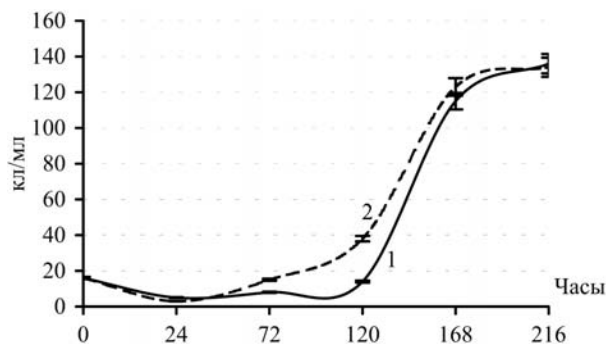


Рис. 6. Динамика численности *P. caudatum* при одновременном культивировании с *Bacillus* sp. Пдт-1 без дизельного топлива (1) и в присутствии топлива (2)

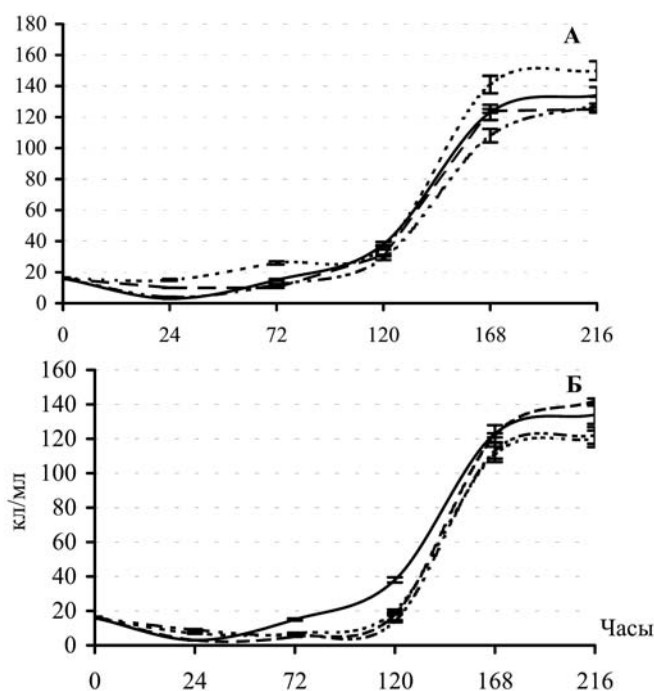


Рис. 7. Динамика численности *P. caudatum* в системе «дизельное топливо-бактерии-простейшие» в условиях лимитирования по азоту (А) и фосфору (Б). 1 – полноценная среда Раймонда, 2 – содержание биогена 10 %, 3 – содержание биогена 50 %, 4 – отсутствие минеральной формы биогена в среде

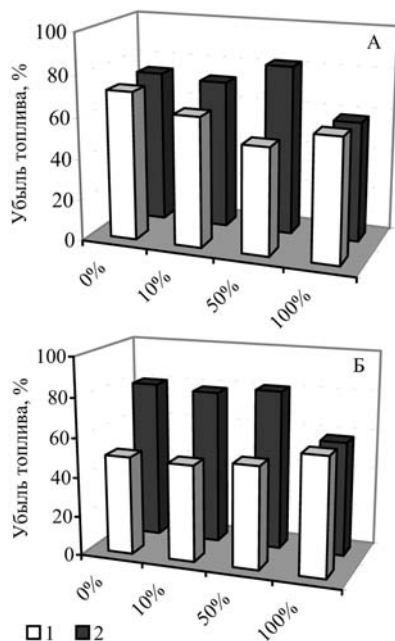


Рис. 8. Убыль дизельного топлива в результате деятельности чистой культуры *Bacillus* sp. Pdт-1 (1) и сообщества «*Bacillus* sp. Pdт-1 + *P. caudatum*» (2) в условиях лимитирования по фосфору (А) и азоту (Б)

фора 50 % является оптимальной для обеспечения возврата необходимого для бактерий количества фосфора в среду.

В отличие от фосфора, лимитирование по азоту приводит к снижению темпов утилизации топлива чистой культурой *Bacillus* sp. Pdт-1 независимо от концентрации биогена. В то же время в условиях дефицита азота также было отмечено значительное увеличение темпов деградации углеводов сообществом протозоя и бактерий по сравнению с полноценной средой (рис. 8).

В отличие от фосфора, в условиях лимитирования по азоту не было отмечено зависимости темпов утилизации топлива от концентрации биогенного элемента. Это может быть связано с различным содержанием биогенов в бактериальных клетках. Из двух биогенов азот наряду с кислородом, углеродом и водородом является основным элементом, участвующим в построении клетки, и его содержание в клетках прокариот в пересчете на сухое вещество составляет около 10 % (Гусев, Минеева, 2003). Так, в анаболических реакциях, где цикл углерода сопряжен с циклами азота и фосфора, соотношение С орг. : N орг. составляет 6 : 1, а соотношение С : P \geq 100 : 1 (Заварзин, 2003).

Кроме того, при развитии в среде с топливом сообщества бактерий и протозоя наблюдалось образование глобул, отсутствовавших в вариантах, где утилизация топлива происходила только под действием бактерий. Образование подобных конгломератов в среде, где инфузории и бактерии развивались в отсутствие топлива, не отмечено. В результате анализа было выявлено наличие углеводов с длиной цепи C₁₈₋₂₂ в составе глобул, образующихся при развитии *P. caudatum*. В составе глобул, образующихся при развитии сообщества бактерий и простейших были обнаружены только углеводороды C₁₆ и C₁₉ в количествах, близких к следовым. То есть деградация углеводов продолжалась и после образования данных конгломератов.

Таким образом, биомасса углеводородокисляющих бактерий активно использовалась цилиатами как кормовой ресурс. Влияние условий культивирования бактерий (источник углерода), используемых в качестве пищи, на динамику роста простейших проявлялось в изменении характера кривых численности *Paramecium caudatum*. Утилизация нефтяных углеводородов бактериями сопровождалась внутриклеточным накоплением алканов. Состав углеводородов в биомассе бактерий зависел от типа потребляемых углеводородов (летучие, жидкие). Дальнейшее выедание инфузориями бактерий, утилизирующих углеводороды, сопровождалось миграцией алканов в клетки простейших. Функционирование сообщества «бактерии–простейшие» увеличивало эффективность утилизации нефтепродукта в условиях лимитирования по фосфору и азоту по сравнению с деятельностью чистой культуры бактерий.

Литература

Гуревич Ю.Л., Ладыгина В.П., Теремова М.И. Дegrаdация техногенных потоков вещества сообществом микроорганизмов и простейших // Изв. РАН. Сер. биол. 1995. № 2. С.226–230.

- Жиркова А.Д.* Влияние некоторых антропогенных факторов и биологически активных веществ на жизнедеятельность пресноводных инфузорий: Автореф. ...канд. биол. наук. Владивосток, 2004. 18 с.
- Заварзин Г.А.* Лекции по природоведческой микробиологии. М.: Наука, 2003. 348 с.
- Звягинцева И.С., Суровцева Э.Г., Поглазова М.Н., Ивойлов В.С., Беляев С.С.* Деграция нефтяных масел нокардиоформными бактериями // Микробиология. 2001. Т. 70, № 3. С. 270–277.
- Гусев М.В., Минеева Л.А.* Микробиология. М.: Академия, 2003. 464 с.
- Квасников Е.И., Ключникова Т.М.* Микроорганизмы – деструкторы нефти в водных бассейнах. Киев: Наук. думка, 1981. 132 с.
- Количественные методы в почвенной зоологии / под ред. Гилярова М.С. М.: Наука, 1987. 288 с.
- Копылов А.И., Романенко А.В., Масленникова Т.С., Мильникова З.М., Столбунова В.Н., Соловьева В.В.* Структура пищевой сети сообщества планктона Рыбинского водохранилища: сезонные изменения роли микробальной «петли» // Материалы Междунар. конф.: Трофические связи в водных сообществах и экосистемах. Борок, 2003. С. 56–57.
- Коронелли Т.В.* Поступление углеводов в клетки микроорганизмов // Успехи микробиологии. М.: Наука, 1980. Вып.15. С. 99–111.
- Кренева К.В.* Влияние нефтяного загрязнения на формирование сообщества инфузорий проток косы Чушка (Азовское море) // Совр. пробл. водной токсикологии. Борок, 2002. С. 165–166.
- Кузнецов С.И., Дубинина Г.А.* Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989. 288 с.
- Плохинский Н.А.* Биометрия. М.: Изд-во МГУ, 1970. 367 с.
- Суровцева Э.Г., Ивойлов В.С., Беляев С.С.* Разрушение ароматической фракции ассоциацией грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов // Микробиология. 1997. Т. 66, № 1. С. 78–83.
- Эрнестова Л.С.* Усовершенствование методики суммарного определения нефтепродуктов в почве // Гигиена и санитария. 1981. № 11. С. 45–46.
- Watson J.M.* Mechanism of bacterial fluctuation, caused by Protozoa // Nature. 1945. V. 45. P. 1–271.