

**ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ КРИОМИКРОБОЦЕНОЗОВ
В ЭСТУАРИИ РЕКИ АМУР**

Л.М. Кондратьева¹, О.Ю. Стукова¹, П.Я. Тищенко²

¹*Институт водных и экологических проблем ДВО РАН, ул. Ким-Ю-Чена, 65,
Хабаровск, 680000, Россия. E-mail: kondrlm@rambler.ru*

²*Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН,
ул. Балтийская, 43, Владивосток, 690041, Россия. E-mail: tpavel@poi.dvo.ru*

Представлены результаты микробиологических исследований керна льда, отобранного в эстуарии реки Амур. Проведен анализ потенциальной активности микробных комплексов (криомикробоценозов) из различных слоев льда по отношению к биохимически мобильным источникам углерода (пептон, глюкоза) и стойким полициклическим ароматическим углеводородам (нафталин и фенантрен). Показано, что в весенний период качество воды в прибрежных морских акваториях может зависеть от процессов трансформации и деструкции, аккумулированных во льдах органических веществ, которые происходят при участии микроорганизмов.

ACTIVITY OF CRYOMICROBOCENOSIS IN THE AMUR RIVER ESTUARY

L.M. Kondrateva¹, O.Yu. Stukova¹, P.Ya. Tishchenko²

¹*Institute of Water and Ecology Problems FEB RAS, 65 Kim-Yu-Chen Str.,
Khabarovsk, 680000, Russia. E-mail: kondrlm@rambler.ru*

²*V.I.I'ichev Pacific Oceanological Institute FEB RAS, 43 Baltiyskaya Str.,
Vladivostok, 690041, Russia. E-mail: tpavel@poi.dvo.ru*

Microbiological studies of the ice cores in the estuary of the Amur River have been conducted. The potential activity of microbial complexes (cryomicrobocenosis) from different layers of ice in relation to quickly recyclable carbon sources (peptone and glucose) and persistent polycyclic aromatic hydrocarbons (naphthalene and phenanthrene) was analyzed. It is shown that in the spring water quality of coastal waters may depend on the processes of transformation and degradation of organic matter accumulated in the ice that occur with the participation of microorganisms.

ВВЕДЕНИЕ

Формирование качества воды в гидросфере осуществляется под влиянием многочисленных эндогенных и экзогенных факторов. Пространственно-временная целостность водных экосистем, сезонность воздействия отдельных факторов определяют актуальность изучения гляциохимических и биохимических процессов, происходящих во льдах. Взаимодействуя с двумя средами (водной и воздушной) лед выступает мощным аккумулятором токсичных веществ. Криогенная метаморфизация химического состава природных вод – чрезвычайно важный процесс, происходящий в водных экосистемах в период ледостава. При образовании и таянии льдов осуществляется крупномасштабный газообмен в системе атмосфера–гидросфера–криосфера. Лед выступает важным фактором формирования экологической ситуации в водных экосистемах и промежуточным звеном в гляциогенной

миграции веществ (Иванов, 1998). С таянием ледяного покрова связывали загрязнение воды озер и рек фенолами, нефтепродуктами, кислотами и др. В начальный период таяния льдов и снежного покрова в воде отмечали повышение концентрации фенолов на 30 % (Иванов, Неудачин, 1987).

Лед относится в специфической экологической нише, в которой обитают различные группы фототрофных и гетеротрофных организмов (Юрьев, 1996; Price, 2000; Mader et al., 2006). Важную функцию во льдах осуществляют микробные комплексы – криомикробоценозы. Они участвуют в деструкции автохтонных и аллохтонных органических веществ, способствуют миграции биогенных элементов, влияют на изменение структуры биоценозов и выступают в качестве индикаторов антропогенного загрязнения водных экосистем (Kondratyeva, 2002).

Согласно микробиологическим исследованиям различных местообитаний было показано, что бактерии при низких температурах не только сохраняют свою жизнеспособность, но и способны утилизировать питательные вещества. В ледовой матрице существуют многочисленные каналы, формирующие сложную сеть, заполненную водой. Бактериальные клетки сохраняют свою жизнеспособность и подвижность в этой сети при широком диапазоне низких температур от -4°C до -33°C (Thomas, Dieckmann, 2002; Wells, Deming, 2003; Junge et al., 2004; Bakermans, Skidmore, 2011).

В весенний период во время таяния и миграции льдов может происходить единовременное высвобождение в водную среду различных токсичных веществ. Лед является важным объектом геоэкологических исследований и структурным компонентом междисциплинарного мониторинга загрязнения водных экосистем и гидросферы в целом (Кондратьева, 2010; Кондратьева и др., 2011). Хозяйственная деятельность человека вносит существенные изменения в гляциогенный круговорот веществ, влияет на условия специфической экологической ниши, в которой осуществляются сложные продукционно-деструкционные процессы.

К наиболее актуальным направлениям в исследовании льдов относятся:

- выяснение роли ледовых образований в миграции поллютантов;
- выбор методов оценки уровня загрязнения льдов, в том числе с использованием современных спектральных методов и биодиагностики;
- изучение механизмов трансформации вещества и энергии при участии фототрофных и гетеротрофных организмов в контактной зоне вода–лед и толще льда.

Основная задача наших исследований состояла в определении активности криомикробоценозов из разных слоев керна льда, отобранного в эстуарии р. Амур по отношению к быстро утилизируемым органическим веществам (пептон, глюкоза) и стойким полициклическим ароматическим углеводородам (нафталин, фенантрен).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Керн льда был отобран в Амурском лимане в районе п. Пронге сотрудниками Тихоокеанского океанологического института ДВО РАН во время комплексной экспедиции по программе «Амур» в апреле 2008 г. В формировании химического состава льдов на этом участке важную роль играет сток р. Амур, который в зимнее время перераспределяется в южном направлении (Дударев и др., 2000). Глубина в месте отбора керна льда составляла 5 м, толщина льда – 97 см.

Для экспериментальных микробиологических исследований в качестве инокулята использовали расплавы отдельных слоев льда. Определение общей численности гетеротрофных бактерий (ГБ) проводили традиционным методом посева на рыбо-пептонный агар, разбавленный в 10 раз (РПА:10) и выражали в КОЕ/мл (колонии образующие единицы в 1 мл расплава льда). Общая характеристика расплавов льда представлена в табл. 1.

Таблица 1

Общая характеристика расплавов льда

Слой льда, см	Характеристика расплава	Соленость, ‰	Численность ГБ, КОЕ/мл	Количество морфотипов колоний, доминанты
0–10	Много взвесей, серый цвет	0,059	< 5000	Сплошной рост
10–20	Илистая взвесь, светло желтый цвет	0,161	2666	4 (бесцветные, пастообразные)
20–30	Тонкая взвесь, светло желтый цвет	0,018	850	3 (бесцветные, пастообразные)
30–40	Желтый цвет, мелкие хлопья	0,025	2140	3 (бесцветные, слизистые)
40–50	Желто-бурый цвет, прозрачный	0,019	416	6 (желтые, оранжевые)
50–60	Бесцветный, прозрачный	0,018	333	4 (бесцветные, точечные)
60–70		0,017	263	2 (крупные, слизистые)
70–83		0,016	10	1 (единичные, точечные)
83–97		0,016	80	2 (слизистые)

Для оценки потенциальной активности криомикробоценозов (КМ) из различных слоев льда использовали несколько источников углерода. Быстро утилизируемые органические вещества (ОВ) использовали в следующих концентрациях: глюкоза – 0,2 %; пептон – 0,2 %; фенол – 0,1 %. Стойкие полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) нафталин и фенантрен вносили в виде измельченной пудры из расчета 1 г/л в пробирки со стерильной горячей питательной средой. В качестве минеральной основы использовали жидкую среду М-9 следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1,33; K_2HPO_4 – 2,67; NH_4Cl – 1; Na_2SO_4 – 2; KNO_3 – 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – следы. В модельных экспериментах в пробирки с питательной средой вносили расплав льда из расчета 1 мл на 10 мл питательной среды.

Влияние режима солености на активность роста криомикробоценозов исследовали путем внесения в питательную среду NaCl (1–3 %). Культивирование микроорганизмов проводили при 20 °С. Активность роста КМ (накопление биомассы бактерий) определяли фотометрически по изменению оптической плотности (ОП) культуральной жидкости при 490 нм (КФК-56 М) и образованию цветных продуктов. Все эксперименты проводили в 3-х повторностях. В таблицах представлены средние значения показателей роста.

Результаты и обсуждение

Принимая во внимание, что численность микроорганизмов отражает общее содержание ОВ в воде, участвующей в формировании льда в эстуарии р. Амур, в расплавах была определена общая численность гетеротрофных бактерий. Как видно из табл. 1, их численность постепенно снижалась по направлению к нижним слоям льда. Такую закономерность мы неоднократно отмечали при исследовании льда в р. Амур. Максимальная численность КМ была установлена в верхнем слое льда 10–20 см, в расплаве которого содержались взвешенные вещества. Сопоставимая высокая численность КМ была отмечена в 30–40 см слое льда. По визуальным характеристикам выделялся расплав 40–50 см слоя льда. Несмотря на более низкую численность бактериальных колоний, структура КМ отличалась присутствием разнообразных пигментированных колоний. Самый чистый прозрачный расплав получен из 70–83 см слоя льда. Эти данные свидетельствуют о том, что в формировании ледового покрова в эстуарии р. Амур принимали участие природные воды с различным содержанием растворенных и взвешенных органических веществ. Важно

подчеркнуть, что в период отбора керна льда (5 апреля 2008 г.) в подледной воде численность бактериопланктона была значительно выше, чем в нижнем слое льда.

Флуктуации численности микробных комплексов могут быть обусловлены качеством воды в период формирования конкретного слоя льда и присутствием автохтонных жизнеспособных бактериальных клеток. Не исключено, что в течение всего зимнего периода их численность могла увеличиваться в результате активного метаболизма. Согласно полученным результатам с начала ледостава качество воды в Амурском лимане постепенно улучшалось. Прежде всего, это связано с отсутствием поступления в речную сеть поверхностного стока, содержащего взвешенные вещества. Нами неоднократно отмечалось, что качество воды в р. Амур с начала ледостава улучшалось, за исключением экстраординарных случаев, связанных с аварийными ситуациями или сбросом неочищенных сточных вод (Кондратьева, 2010; Кондратьева, Фишер, 2012).

Наиболее актуальным является вопрос, связанный с исследованием активности КМ по отношению к различным источникам углерода, которые содержатся в замерзающей воде и постепенно накапливаются в толще льда. Наиболее распространенными являются азотсодержащие органические вещества (NOB), в разложении которых принимают участие аммонифицирующие, нитрифицирующие и денитрифицирующие бактерии. Активность этих групп бактерий зависит от комплекса абиотических факторов. В наших исследованиях мы обратили внимание на характер утилизации модельного NOB–пептона при различном

Таблица 2

**Активность роста криомикробоценозов (ОП 490 нм)
на NOB при различном режиме солености**

Слой льда, см	Условия культивирования		
	Пептон	Пептон + 1 % NaCl	Пептон + 3 % NaCl
0–10	0,36	0,32	0,28
10–20	0,42	0,47	0,35
20–30	0,33	0,43	0,31
30–40	0,34	0,40	0,36
40–50	0,37	0,44	0,35
50–60	0,32	0,32	0,28
60–70	0,37	0,47	0,40
70–83	0,12	0,06	0,11
83–97	0,42	0,36	0,36

Таблица 3

**Активность роста криомикробоценозов (ОП 490 нм)
на глюкозе при различном режиме солености**

Слой льда, см	Условия культивирования		
	Глюкоза	Глюкоза + 1 % NaCl	Глюкоза + 3 % NaCl
0–10	0,19	0,18	0,19
10–20	0,20	0,27	0,27
20–30	0,19	0,25	0,15
30–40	0,19	0,24	0,16
40–50	0,24	0,26	0,36
50–60	0,23	0,28	0,31
60–70	0,23	0,26	0,27
70–83	0,14	0,093	0,11
83–97	0,26	0,31	0,25

содержании NaCl в питательной среде. Было установлено что, начиная со слоя льда 10–20 см, криомикробоценозы, независимо от их численности, наиболее активно развивались на пептоне в присутствии 1 % NaCl (табл. 2). По отношению к NOB, независимо от режима солености, наименее активными были КМ из слоя льда 70–83 см. Можно предположить, что в верхнем и нижних слоях льда в структуру микробоценозов входили пресноводные представители, которые наиболее активно утилизировали пептон при отсутствии NaCl, и, в тоже время, они обладали галотолерантностью.

Активность криомикробоценозов из разных слоев льда по отношению к глюкозе, которая является основным водорастворимым продуктом трансформации биомассы растительных остатков, также существенно различалась (табл. 3). Общей закономерностью с ростом на пептоне можно считать низкую активность бактериального сообщества на

глюкозе из 70–83 см слоя льда. Это соответствует высокому качеству воды в период формирования этого слоя льда и низкой численности КМ, способных утилизировать легкодоступные ОВ. Были выявлены предпочтения к разным концентрациям NaCl. Криомикробоценозы практически из всех слоев льда активнее развивались в присутствии 1 % NaCl. Галотолерантными оказались КМ из нижних слоев льда и особенно из 40–50 см слоя, из которого были выделены пигментированные колонии. Выявленные различия в галотолерантности КМ могут быть связаны с изменением структуры бактериального сообщества и разными адаптационными возможностями микроорганизмов.

Известно, что ароматические ОВ поступают в водные экосистемы от различных источников и могут иметь природное и антропогенное происхождение. Они также отличаются по своей растворимости в воде и устойчивости к разложению. В нашем эксперименте были использованы моноциклический фенол, бициклический нафталин и трехциклический фенантрен. Персистентность и гидрофобность ПАУ предопределяют более длительные по времени экспериментальные исследования.

Таблица 4

Активность роста криомикробоценозов (ОП 490 нм) на ароматических соединениях различного строения

Слой льда, см	Фенол	Нафталин	Фенантрен
0–10	0,198	0,26	0,4
10–20	0,198	0,42	0,45
20–30	0,19	0,36	0,15
30–40	0,149	0,30	0,17
40–50	0,133	0,33	0,37
50–60	0,116	0,29	0,19
60–70	0,054	0	0,08
70–83	0	0	0
83–97	0,07	0,24	0,1

Данные представленные в табл. 4 свидетельствуют о том, что малочисленное бактериальное сообщество из 70–83 см слоя льда не использовало ароматические соединения в качестве источника углерода, независимо от их молекулярного веса (фенол, нафталин и фенантрен). По отношению к фенолу было установлено ярко выраженное вертикальное снижение активности криомикробоценозов от верхних слоев к нижним слоям льда. В верхней части керна льда (до 30 см) присутствовали бактерии, устойчивые к фенолу и способные его утилизировать. Это может быть связано с загрязнением воды фенольными соединениями в

начале ледостава или их образованием в толще льда в результате микробиологической трансформации высокомолекулярных предшественников. Фенол ингибировал рост бактерий из нижних слоев льда (от 60 до 97 см), которые, по всей видимости, не обладали фенолксидазами вследствие отсутствия этих соединений в среде их обитания.

По отношению к ПАУ вертикальная стратификация в активности криомикробоценозов была менее выражена, чем на феноле. Максимальная активность по отношению к нафталину и фенантрону была установлена в слое льда 10–20 см, который мог сформироваться за счет воды, загрязненной углеводородами различного генеза, в том числе поступающими с речным стоком. Для летнего периода было показано, что среди ПАУ, поступающих со стоком реки Амур в эстуарий, доминировали нафталин и фенантрен. Проведенные расчеты с использованием специальных маркеров показали, что в летнее время основными источниками ПАУ являются процессы сжигания различных видов топлива (Чижова и др., 2013).

Несмотря на высокую численность КМ из 30–40 см льда, нафталин и фенантрен разлагались в течение всего эксперимента более медленно, чем из выше расположенного слоя льда. Известно, что трансформация ПАУ зависит от комплекса факторов окружающей среды и биохимических процессов, обусловленных микробным метаболизмом (Peng et al., 2008; Haftka et al., 2010).

Высокую активность к обоим представителям ПАУ проявляли КМ из 40–50 см слоя льда, расплав которого имел желто-бурю окраску, характерную для гумифицированных природных вод, и богатое по структуре бактериальное сообщество. При культивировании на фенантрене через 90 суток было зарегистрировано накопление цветных интермедиатов. Согласно литературным источникам фенантрен может разлагаться с образованием промежуточных продуктов различной степени токсичности: фталевые кислоты, нафтол, салициловая кислота и др. (Zhao et al., 2008).

Ранее было показано, что в самоочищении Амурского лимана и прибрежных морских акваторий от ароматических углеводородов участвуют планктонные и бентосные микробные комплексы (Кондратьева, Стукова, 2008). Согласно полученным данным крио-микробоценозы также обладают ферментными системами, способными наряду с биохимически лабильными ОБ трансформировать стойкие углеводороды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов можно предполагать, что в период формирования ледового покрова со стоком реки Амур в эстуарий поступают органические вещества различного генезиса, которые затем аккумулируются во льдах. Большое значение имеют нефтяные углеводороды и продукты трансформации высокомолекулярных природных гетероциклических соединений, которые вовлекаются в биогеохимические процессы при участии криомикробоценозов. В начале формирования ледового покрова существенный вклад в загрязнение верхних слоев льда могут вносить органические вещества, поступающие с поверхностным стоком с территории водосбора р. Амур. В дальнейшем роль источников поступления загрязняющих веществ в нарастающий ледовый покров могут играть неочищенные сточные воды, зимние сбросы с водохранилищ и донные отложения, в которых происходит микробиологическая трансформация высокомолекулярных органических веществ, вовлеченных в постседиментационные процессы.

В весенний период во время таяния льда в водную среду прибрежных морских акваторий могут поступать аккумулированные органические вещества различного строения и продукты их микробиологической трансформации. Токсикологические свойства и аддитивные эффекты для гидробионтов этих интермедиатов мало изучены.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают свою глубокую признательность и благодарность всем коллегам, участвовавшим в экспедиции в Амурском лимане в апреле 2008 г. за предоставленную возможность провести микробиологические исследования в период ледостава.

ЛИТЕРАТУРА

- Дударев О.В., Боцул А.И., Аникеев В.В., Якунин Л.П., Колесов Г.М. 2000.** Современное осадконакопление в эстуарии р. Амур // Тихоокеан. геология. Т. 19, № 3. С. 30–43.
- Иванов А.В., Неудачин А.П. 1987.** Фенолы в снежном покрове и талых водах антропогенных и естественных ландшафтов // Методы оценки состояния природной среды. Владивосток. С. 45–51.
- Иванов А.В. 1998.** Криогенная метаморфизация химического состава природных льдов, замерзающих и талых вод. Хабаровск: Дальнаука. 164 с.
- Кондратьева Л.М., Стукова О.Ю. 2008.** Биоиндикация загрязнения эстуария реки Амур полиароматическими углеводородами // Гидробиол. журнал. № 5. С. 54–68.
- Кондратьева Л.М. 2010.** Геоэкологические исследования речного льда // Геоэкология. Инженерная геология. Гидрогеология. Геокриология. № 6. С. 511–520.

- Кондратьева Л.М., Бардюк В.В., Жуков А.Г. 2011.** Аккумуляция и трансформация токсичных веществ во льдах рек Амур и Сунгари после техногенной аварии в Китае в 2005 г. // Лед и снег. № 4. С. 118–124.
- Кондратьева Л.М., Фишер Н.К. 2012.** Микробиологические исследования льдов рек Амур и Сунгари // Криосфера Земли. Т. XVI, № 1. С. 82–93.
- Чижова Т.Л., Тищенко П.Я., Кондратьева Л.М., Кудряшова Ю.В., Каваниши Т. 2013.** Полициклические ароматические углеводороды в эстуарии р. Амур // Вода: Химия и Экология. № 10. С. 14–22.
- Юрьев Д.Н. 1996.** Речной лед как субстрат для развития планктонных водорослей // Эколого-биогеохимические исследования на Дальнем Востоке. Вып. 1. Владивосток: Дальнаука. С. 79–96.
- Bakermans C., Skidmore M. 2011.** Microbial respiration in ice at subzero temperatures (-4°C to -33°C) // Environ. Microbiol. Reports. V. 3, N 6. P. 774–782.
- Haftka J.J., Govers H.A., Parsons J.R. 2010.** Influence of temperature and origin of dissolved organic matter on the partitioning behavior of polycyclic aromatic hydrocarbons // Environ. Sci. Pollut. Res. V. 17, N 5. P. 1070–1079.
- Junge K., Eicken H., Deming J. W. 2004.** Bacterial activity at -2 to -20°C in Arctic wintertime sea ice // Appl. Environ. Microbiol. V. 70. P. 550–557.
- Kondratyeva L.M. 2002.** Ice as component of surface water pollution monitoring // Proceedings of Intern. Conference «Enviromis–2002», N 1, Russia (Tomsk). P. 174–180.
- Mader H.M., Pettitt M.E., Wadham J.L., Wolff E.W., Parkes R.J. 2006.** Subsurface ice as a microbial habitat // Geology. V. 34. P. 169–172.
- Peng R.H., Xiong A.S., Xue Y., Fu X.Y., Gao F., Zhao W., Tian Y.S., Yao Q.H. 2008.** Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons // FEMS Microbiol. Rev. V. 32, N 6. P. 927–955.
- Price P. B. 2000.** A habitat for psychrophiles in deep Antarctic ice // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. V. 97. P. 1247–1251.
- Thomas D. N., Dieckmann G. S. 2002.** Antarctic sea ice—a habitat for extremophiles // Science. V. 295. P. 641–644.
- Wells L. E., Deming J. W. 2003.** Abundance of *Bacteria*, the *Cytophaga-Flavobacterium* cluster and *Archaea* in cold oligotrophic waters and nepheloid layers of the Northwest Passage, Canadian Archipelago // Aquat. Microb. Ecol. V. 31. P. 19–31.
- Zhao H. P., Wang L., Ren J. R., Li Z., Li M., Gao H. W. 2008.** Isolation and characterization of phenanthrene-degrading strains *Sphingomonas* sp ZP1 and *Tistrella* sp ZP5 // Journal of Hazardous Materials. V. 152. P. 1293–1300.