

УДК 576.8.095.3:547.912

С. И. Рубцова

КАЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ ПРИБОЙНОЙ ЗОНЫ ЧЕРНОГО МОРЯ

Проблема охраны окружающей среды приобрела в настоящее время глобальное значение. Нефть и нефтепродукты являются одним из наиболее распространенных загрязняющих веществ. Загрязнение морской среды нефтью привело к развитию исследований по изучению гетеротрофных микроорганизмов, способных использовать углеводороды в качестве единственного источника углерода и энергии. Количественное содержание нефтеокисляющих микроорганизмов является свидетельством идущего процесса естественного самоочищения морской среды от нефти и нефтепродуктов. Именно в результате деятельности нефтеокисляющих бактерий происходит трансформация нефтяного загрязнения до простых соединений и тем самым включение нефтяного загрязнения в общий круговорот углерода в океане [3, 9, 10].

В связи с этим приобретает большую актуальность работы по изучению нефтеокисляющего бактериального населения и их участие в деструкции нефти в прибойной зоне моря.

Вопросами, связанными с микробным окислением нефтяных углеводородов в Черном море, посвящена обширная литература, в том числе и работы отдела морской санитарной гидробиологии ИнБЮМ НАН Украины [2, 3, 4, 5, 8]. Однако процессы микробного окисления нефти и нефтепродуктов в прибойной зоне моря практически не освещены. Прибойная зона относится к контактной зоне "суша-море", где сталкиваются и концентрируются потоки загрязняющих веществ, идущих как с суши, так и со стороны моря. Целью настоящей работы явилось изучение бактериального населения в прибойной зоне моря и их способности окислять нефтяные углеводороды.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Сбор материала проводился на пяти полигонах в прибрежной акватории Севастополя с глубин 0,25-2 м. Полигоны были расположены так, чтобы охватить исследованиями различные по интенсивности загрязнения, составу донных осадков, удаленности от открытой части моря, участки Севастопольских бухт. Полигон 1 расположен в бухте Севастопольская (Приморский бульвар), 2 – в бухте Северная, 3 – в Учкучевке, 4 – в бухте Круглая (у выхода из бухты), 5 – в бухте Круглая (в районе вершины). Схема расположения полигонов представлена на рис. 1.

Пробы морской воды и донных осадков отбирались ежемесячно с декабря 1999 по апрель 2002 года на станциях в прибойной зоне Севастополя с глубины до 0,5 м. Всего было отобрано 282 пробы морской воды и 185 проб донных осадков. Отбор их осуществлялся дночерпателем Петерсена и ручным пробоотборником.

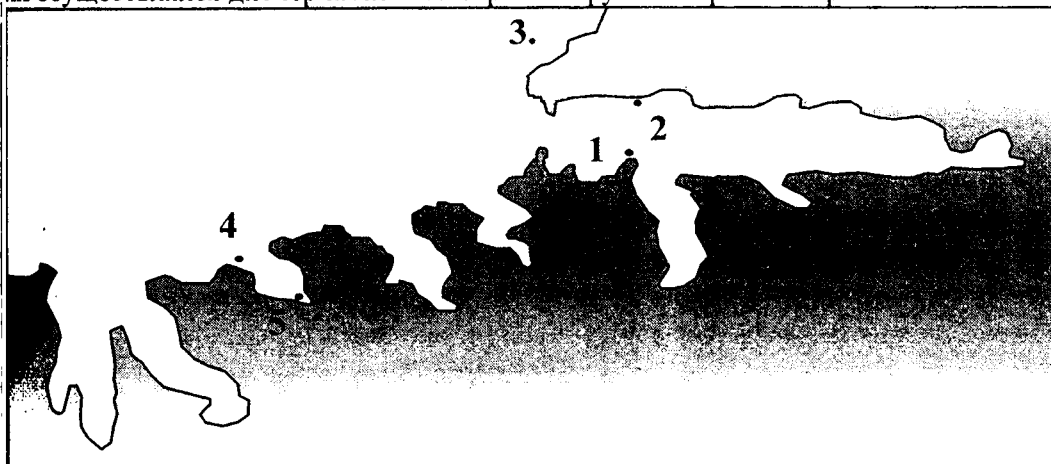


Рис. 1. Схема расположения станций отбора проб в прибойной зоне г. Севастополя

Выделение чистых культур гетеротрофных бактерий проводилось посевом исследуемых проб воды и донных осадков на стандартный рыбо-пептонный агар, нефтеокисляющих – посевом чистой гетеротрофной культуры на жидкую среду Диановой-Ворошиловой с нефтью.

Определение микроорганизмов до рода проводилось по [1, 6]. Микроскопию культур бактерий проводили на микроскопе «МБИ-3» и «Jenaval».

Морфолого-культуральные и физиолого-биохимические свойства микроорганизмов изучали согласно руководству А.Г. Родиной [7].

Количество нефтяных углеводородов в донных осадках определяли методом инфракрасной спектроскопии, хлороформэкстрагируемых веществ – весовым методом. Количественный учет нефтеокисляющих бактерий приводился методом предельных разведений на минеральной среде Диановой-Ворошиловой с добавлением нефти. Параллельно проводится посев морской воды и донных осадков на пептонной воде для определения общего количества гетеротрофных бактерий. Данные подвергались статистической обработке по методу Мак-Креди [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из прибойной зоны Севастопольских бухт было выделено 281 культура водной микрофлоры, из них на долю нефтеокисляющих приходится около 100 культур.

На культуры рода *Pseudomonas* – приходится 54% выделенных культур, представители других родов встречались реже. На долю микроорганизмов, отнесенных к роду *Marinomonas*, приходится 7%, *Azotobacter* - 4%, *Erithrobacter* - 5 %, *Marinococcus* - 6 %, *Mezophilobacter* - 6 %, *Altheromonas* - 5 %, *Bacillus* - 5 %, *Microbacterium* - 4 %. Представители родов *Arthrobacter*, *Micrococcus* и *Vibrio*

встречались в единичных случаях, и на их долю приходится около 1 % от всех родов микроорганизмов (Рис. 2).

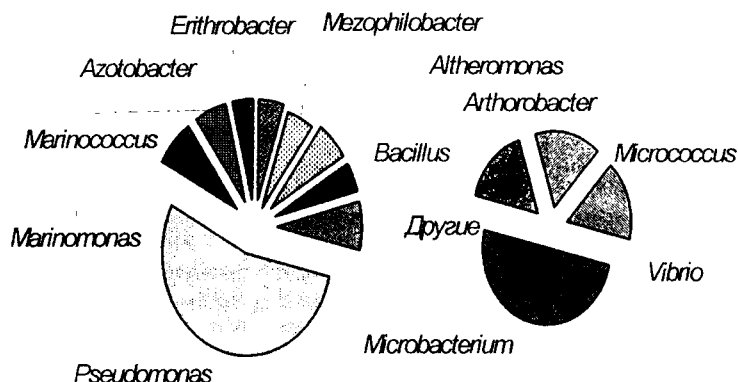


Рис. 2. Родовое разнообразие выделенных микроорганизмов

Качественная характеристика нефтеокисляющих микроорганизмов, выделенных из воды и донных осадков в прибойной зоне Севастопольских бухт, представлена в таблице 1.

Таблица 1.
Качественная характеристика нефтеокисляющих микроорганизмов, выделенных из воды (А) и донных осадков (Б) Севастопольских бухт

Род	Число культур	Ст. 1		Ст. 2		Ст. 3		Ст. 4		Ст. 5	
		А	Б	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б
<i>Pseudomonas</i>	44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Marinomonas</i>	6	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
<i>Marinococcus</i>	5	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>Azotobacter</i>	3	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Erithrobacter</i>	4	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Mezophilobacter</i>	5	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
<i>Altheromonas</i>	5	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
<i>Bacillus</i>	4	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>Microbacterium</i>	3	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Arthrobacter</i>	1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Vibrio</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Наибольшее разнообразие родов отмечено на станциях, расположенных в глубине бухт со значительными количествами нефтяных углеводородов (более 8 мг/100 г) и хлороформекстрагируемых веществ (более 0,08 г/100 г) (Рис.3). Это станции в бухтах Северная и Круглая (район вершины). Наибольшая численность

**КАЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ
ПРИБОЙНОЙ ЗОНЫ ЧЕРНОГО МОРЯ**

гетеротрофных (10^6 - 10^7 кл./г) и нефтеокисляющих (10^3 - 10^4 кл./г) бактерий в прибойной зоне акватории Севастополя отмечены на станциях, подверженных сильной антропогенной нагрузке, и расположенных в глубине бухт. Высокая численность гетеротрофных бактерий свидетельствует о протекающих процессах эвтрофикации на этих полигонах.

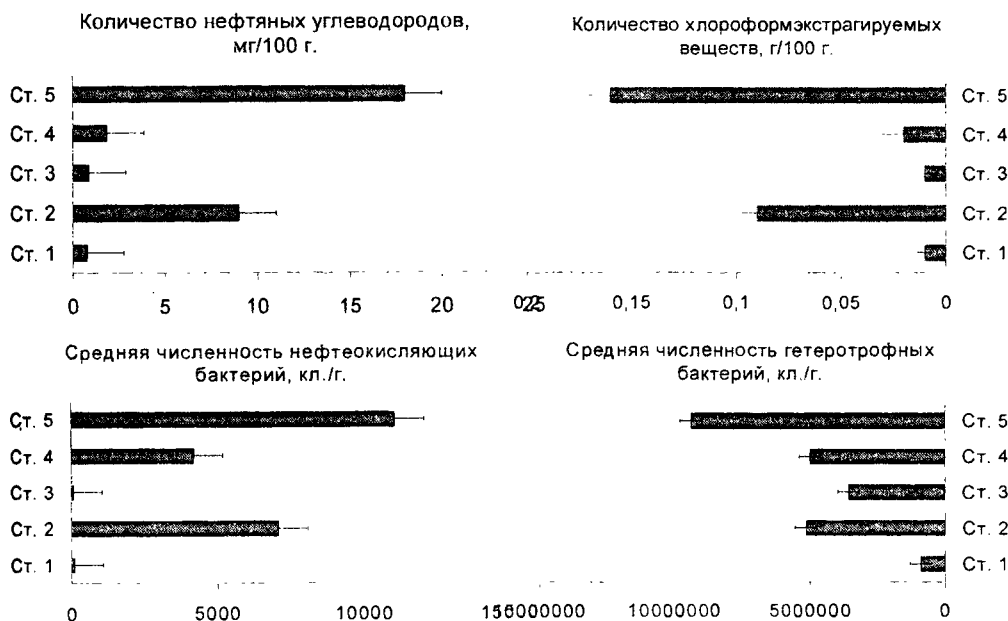


Рис. 3. Данные по исследуемым показателям в донных осадках на станциях отбора проб

Культуры рода *Pseudomonas* встречались во все сезоны года и выделялись на специальной среде с углеводородами в большом количестве. Культуры рода *Pseudomonas*, выделенные нами из прибойной зоны моря, отличались несколько меньшими размерами, по сравнению с палочковидными формами этого же рода, выделенного из открытых частей моря [2]. Полученные данные согласуются с исследованиями многих авторов [2, 5] в том, что 50-80 % микроорганизмов, населяющих прибрежную зону моря, относятся к роду *Pseudomonas*.

Культуры других родов встречались несколько реже, на их долю приходится около 40 % от общего числа выделенных культур. По-видимому, им необходим более длительный период адаптации к углеводородам; возможно также, что некоторые из микроорганизмов не выносят повышенных концентраций углеводородов.

На рыбо-пептонном агаре клетки образовывали круглые и неправильной формы колонии, выпуклые или плоские, просвечивающиеся и полупросвечивающиеся, бесцветные или слабоокрашенные, чаще всего однообразные по культуральным признакам.

Характерной особенностью большинства выделенных культур является образование сине-зеленого флюоресцирующего пигмента. Особенно хорошо флюоресценция наблюдалась в ультрафиолетовых лучах.

Все выделенные культуры были проверены на способность использовать различные источники углерода. Процентное содержание гетеротрофных бактерий, использующих в своей жизнедеятельности нефтяные углеводороды, было значительно – 10-27 % от всего гетеротрофного населения. Процентное соотношение культур, использующих в качестве единственного источника углерода соляр, составило около 58 % от общего числа нефтеокисляющих микроорганизмов, на долю микробов, утилизирующих мазут, приходится около 42 %. Наиболее активными культурами по разрушению нефти, соляра и мазута были представители рода *Pseudomonas*. Процентное содержание нефтеокисляющих бактерий, утилизирующих глюкозу, составило около 80 %, жир - 63 %, фенол - около 30 %, крахмал - 14 % всех выделенных культур.

Изучение физиолого-биохимических свойств нефтеокисляющих микроорганизмов, выделенных из прибойной зоны моря, дают возможность судить об их разносторонней биохимической активности. По-видимому, поступление в прибрежную зону нефти и нефтепродуктов способствует эволюции гетеротрофных бактерий, а высокая численность нефтеокисляющих бактерий свидетельствует о загрязнении прибойной зоны Севастопольских бухт нефтяными углеводородами и о высокой степени адаптации микроорганизмов к их разрушению.

ВЫВОДЫ

1. Наибольшая численность и разнообразие родов гетеротрофных (10^6 - 10^7 кл./г) и нефтеокисляющих (10^3 - 10^4 кл./г) бактерий в прибойной зоне акватории Севастополя отмечено на станциях, подверженных сильной антропогенной нагрузке, и расположенных в глубине бухт. Высокая численность гетеротрофных бактерий свидетельствует о протекающих процессах эвтрофикации на этих полигонах.

2. Из прибойной зоны Севастопольских бухт было выделено 281 культура водной микрофлоры, из них на долю нефтеокисляющих приходится около 100 культур. Определена родовая принадлежность нефтеокисляющих микроорганизмов. На культуры рода *Pseudomonas* – приходится 54% выделенных культур, *Marinomonas* - 7%, *Azotobacter* - 4%, *Erithrobacter* - 5 %, *Marinococcus* - 6 %, *Mezophilobacter* - 6 %, *Altheromonas* - 5 %, *Bacillus* - 5 %, *Microbacterium* - 4 %, *Arthorobacter*, *Micrococcus* и *Vibrio* – около 1 %.

3. Процентное содержание гетеротрофных бактерий, использующих в своей жизнедеятельности нефтяные углеводороды, составило 10-27 % от всего гетеротрофного населения. Процентное соотношение культур, использующих в качестве единственного источника углерода соляр, составляет около 58 % от общего числа нефтеокисляющих микроорганизмов, мазут - 42 %, глюкозу - 80 %, жир - 63 %, фенол - около 30 %, крахмал - 14 % всех выделенных культур.

Список литературы

1. Красильников Н.А. Определитель бактерий и актиномицетов. – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1949. – 825 с.
2. Миронов О.Г. Углевородакисляющие бактерии некоторых районов Тихого и Индийского океанов. В кн.: Биологические исследования в тропической зоне океана. - Киев: Наукова думка, 1975. – С. 16-22.
3. Миронов О.Г., Миловидова Н.Ю., Щекатурина Т.Л. и др. Биологические аспекты нефтяного загрязнения морской среды // Институт биологии южных морей им. А.О.Ковалевского. – Киев.: Наукова думка, 1988. – 248 с.
4. Миронов О.Г., Щекатурина Т.Л., Тархова Э.П. и др. Биоиндикаторы нефтяного загрязнения Черного моря / Динамика вод и продуктивность планктона Черного моря. – М., 1989. – С. 368-381.
5. Миронов О.Г. Нефтеокисляющие бактерии Севастопольских бухт (итоги 30-летних наблюдений) // Экология моря. – 1999. - № 48. – С. 87-92.
6. Определитель бактерий Берджи // Под ред. Дж.Хоуолта, Н. Крига, П. Смита, Дж. Стейли и С. Уильяма. Девятое издание. В 2-х томах. – М.: Изд. «Мир», 1987. – 800с.
7. Родина А.Г. Методы водной микробиологии. – М.-Л.: Наука, 1965. – 347 с.
8. Рубцова С.И. Нефтеокисляющая микрофлора в прибойной зоне г. Севастополя // Ученые записки Таврического Национального университета им. В. И. Вернадского. – 2001. – Том 14 (53) № 2 – С. 151-155.
9. Collwel R. R. Biodegradation of oil in the open ocean. Lash. – J., Raaymakers, - S. Townsville, Australia. – 1993. – P. 53-54.
10. Leahy, J. G. and Colwell, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological Review. – V 54. – 1990. – P. 305-315.

Поступила в редакцию 15.09.2002 г.