

МИКРОБИОЛОГИЯ КРИОСФЕРЫ

УДК 551.32:579

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛЬДОВ
РЕК АМУР И СУНГАРИ

Л.М. Кондратьева, Н.К. Фишер

*Институт водных и экологических проблем ДВО РАН,
680000, Хабаровск, ул. Ким Ю Чена, 65, Россия; kondrlm@rambler.ru, fisher@ivep.as.khb.ru*

Приведены результаты микробиологических исследований льдов рек Амур и Сунгари после техногенной аварии на нефтехимическом заводе в Китае. Показано, что в речном льду присутствуют жизнеспособные микроорганизмы, обладающие высокой потенциальной активностью к разложению различных органических веществ, включая фенолы и полициклические ароматические углеводороды. Криомикробценозы являются биоиндикаторами загрязнения водных экосистем в период ледостава, по их активности можно прогнозировать характер вторичного загрязнения воды продуктами трансформации стойких углеводородов во время весеннего таяния льда.

Криомикробценозы, биоиндикация, загрязнение, река Сунгари, Амур

MICROBIOLOGICAL RESEARCH OF ICES
OF THE AMUR AND SONGHUA RIVERS

L.M. Kondratieva, N.K. Fisher

*Institute of Water and Ecological Problems, FEB RAS,
680000, Khabarovsk, Kim Yu Chen str., 65, Russia; kondrlm@rambler.ru, fisher@ivep.as.khb.ru*

The results of microbiological research of the ice of the Amur and Songhua Rivers after the accident in a petro-chemical plant in China have been presented. It has been demonstrated that the viable microorganisms with high potential activity to decomposition of various organic substances, including phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons, exist in the river ice. Cryomicrobiocenoses are the bioindicators of water ecosystem pollution during the freezing-over. It is possible to predict the character of the secondary water pollution with the products of hydrocarbons transformation during spring ice thawing by cryomicrobiocenoses activity.

Cryomicrobiocenoses, bioindication, pollution, Songhua and Amur River

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время при изучении криосферы основное внимание уделяется исследованиям вечной мерзлоты, криогенному выветриванию горных пород, подземным льдам, геокриологии шельфа и прибрежной зоны Арктики [Баулин и др., 2006]. Наиболее подробно исследуются льды в Арктике и Антарктике. Установлено, что морские льды прибрежных вод Антарктики по своему строению отличаются от льдов Арктики прежде всего тем, что их образование происходит из океанических вод с повышенной соленостью. Арктические льды в значительной степени формируются под влиянием речного стока [Немировская, 2004]. Загрязнение льдов арктических морей хлорорганическими пестицидами также происходит в результате атмосферного переноса и речного стока из районов Северного полушария [Израэль, 2000].

Постоянные ледники называют “архивом” химических соединений, мигрирующих в атмосфере в течение нескольких веков [Matoba et al., 2008]. Лед выполняет особую роль в качестве биогеохимического барьера между различными геосферами и выступает мощным аккумулятором токсичных веществ [Кондратьева, 2002; Немировская, Новигатский, 2003]. Пространственно-временная целостность гидросферы и сезонное воздействие отдельных факторов определяют актуальность изучения гляцио- и биохимических процессов, происходящих в речных льдах [Кондратьева, 2010].

Хотя речной лед имеет плотную структуру, в нем хорошо развита система капилляров и каналов. Поэтому льды представляют собой специфические биотопы или сезонную среду обитания

криобиоценозов, которые представлены водорослями, микромицетами, простейшими и бактериями. Во льдах, несмотря на экстремальные условия существования, происходит довольно активная биогеохимическая трансформация веществ при участии гетеротрофных микроорганизмов [Иванов, 1998; Кондратьева, 2001].

Был проведен подробный анализ распространения микроорганизмов в глубоких слоях биосферы, длительно находящихся при низких температурах. Установлено, что многие из бактериальных изолятов отличались способностью развиваться в широком диапазоне температур (от -10 до 50 °С) и синтезировать *de novo* различные ферменты после оттаивания [Vorobyova et al., 1997]. В гренландском льду были обнаружены представители разных таксономических групп микроорганизмов, которые росли при температурах от 2 до 37 °С, отличались своей ферментативной активностью и даже устойчивостью к антибиотикам [Miteva et al., 2004]. У культивируемых бактерий, найденных в ледниках, проанализирована ферментативная активность по отношению к различным субстратам [Foght et al., 2004]. Подробные микробиологические и таксономические исследования чаще всего проводились в постоянных льдах Арктики и Антарктики [Brinkmeyer et al., 2003; D'Elia et al., 2008], а также в сезонных льдах прибрежных морских акваторий [Могильникова и др., 2009; Garrison et al., 2005; Polteva, Pishchalnik, 2007].

Микробиологические исследования льдов рек и пресноводных озер проводятся крайне редко. Первые подобные исследования рек в период ледостава были сосредоточены на проблеме выживаемости в воде бактерий кишечной группы, поступающих с коммунальными сточными водами [Davenport et al., 1976]. До настоящего времени в сезонных исследованиях, которые проводят во время ледостава (ноябрь–март) на разных реках мира, важное место отводится санитарно-микробиологическим показателям воды, включая присутствие патогенных бактерий и опасных для здоровья человека саповирусов [Kitajima et al., 2010]. В зимний период в реках также изучаются изменения таксономической структуры микробных сообществ эпилимниона и донных отложений [Hullar et al., 2006]. Микробиологические исследования льдов в этих работах не проводились.

Речным льдам по-прежнему уделяется недостаточно внимания, особенно биохимическим процессам, происходящим в их толще при участии гетеротрофных бактерий.

На Амуре биотический комплекс льдов начали изучать в 1970-е гг. на примере фотосинтезирующих организмов – криоперифитона. Повышенное содержание биогенных элементов во льдах и их специфическое неоднородное распределение в толще льда объяснялось только жизнедеятельностью диатомовых водорослей [Лебедев и др., 1981;

Иванов и др., 1987; Юрьев, 1996]. Поэтому в зимний период в качестве биообъекта для индикации загрязнения р. Амур микроэлементами была рекомендована диатомовая водоросль *Melosira*, обитающая на разделе фаз вода–лед [Ивашов, 1994]. Послойное исследование льдов в то время не проводилось.

При интерпретации неоднородности распределения биогенных элементов во льдах обсуждаются главным образом гляциохимические процессы и не уделяется должного внимания микробиологическим процессам. На наш взгляд, неоднородность химического состава льдов является интегральным результатом целого комплекса фундаментальных факторов льдообразования, среди которых специфическая роль принадлежит психрофильным (криофильным) микробным сообществам – криомикробиоценозам (КМЦ). Они участвуют в деструкции автохтонных и аллохтонных органических веществ (ОВ), способствуют миграции биогенных элементов, влияют на изменение структуры биоценозов и выступают в качестве индикаторов антропогенного загрязнения водных экосистем [Кондратьева, 2002].

Известно, что формирование ледяного покрова происходит постепенно, и в процессе криогенеза вовлекаются природные воды разного качества. Поэтому наиболее информативным является послойное исследование льдов. Это позволяет проанализировать не только динамику качества воды в период ледостава, но и зафиксировать случаи аварийных поступлений токсичных веществ, вероятность их миграции и трансформации не только в водной среде, но и непосредственно в толще льда.

Наиболее ярким примером может служить послойное исследование льда р. Сунгари после техногенной аварии на нефтеперерабатывающем заводе в г. Цилинь (КНР) в ноябре 2005 г. По официальным данным в р. Сунгари поступило 100 т нитробензола и других летучих производных бензола. Во время прохождения загрязненных водных масс по р. Сунгари ледовое покрытие у г. Харбина еще отсутствовало. Лед начал формироваться на нижерасположенных участках между городами Цзямусы и Тунцзян. На р. Амур ниже устья р. Сунгари во время прохождения загрязненных водных масс толщина льда составляла около 30–40 см.

Концентрация нитробензола в р. Сунгари через четыре дня после аварии составляла 0,804 мг/л. Для разбавления загрязненных водных масс был произведен спуск воды из водохранилища, расположенного на Сунгари выше места аварии [The Songhua..., 2005]. Это отразилось на скорости прохождения фронта загрязнения, увеличении объема воды и повлияло на ее качественный состав. Максимальная концентрация нитробензола в воде Амура составляла 0,209 мг/л (поверх-

ностные воды у правого берега напротив с. Нижнеспасское) и превышала предельно допустимую концентрацию для водных объектов рыбохозяйственного назначения в 20 раз. Только ниже г. Комсомольска-на-Амуре концентрация нитробензола в воде снизилась до 0,019 мг/л [Бердников и др., 2006].

Химические анализы, проведенные китайскими исследователями, показали, что во время прохождения загрязнения около г. Цзямусы концентрация нитробензола в воде составляла 0,173 мг/л, а в расплаве льда 0,043 мг/л [The Songhua..., 2005]. Позднее, в марте 2006 г., при проведении химических исследований льда, отобранного во время совместного российско-китайского мониторинга на реках Амур и Сунгари, нитробензол не был зафиксирован [Бердников и др., 2006]. Известно, что нитратредуктазами, которые участвуют в трансформации моно- и полинитроароматических соединений, обладает широкий спектр бактерий: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida*, *Rhodobacter capsulatus*, *Bacillus subtilis* и др. [Roldan et al., 2008]. Многие из этих представителей способны к трансформации нитробензола [Nishino, Spain, 1993; Somerville et al., 1995; Park, Kim, 2000]. Поэтому концентрация нитробензола в реках Сунгари и Амур быстро

снижалась не только за счет разбавления по мере перемещения загрязненных водных масс, но и за счет его микробиологической трансформации.

Во льдах был обнаружен широкий спектр органических веществ, которые входят в состав сточных вод нефтеперерабатывающих предприятий (бензол, толуол, ксилол, третбутилфенол) или являются продуктами микробиологической трансформации нитробензола и других ароматических соединений (бензойная, бензоуксусная и бензопропионовая кислоты). Так, в районе г. Цзямусы в слое льда 20–40 см у правого берега, который формировался в момент прохождения нитробензольного загрязнения по р. Сунгари, обнаружена самая высокая суммарная концентрация 14 представителей полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) – 0,348 мкг/л, среди которых доминировал фенантрен – 0,131 мкг/л.

Данная авария привела к прогнозируемой экологической проблеме – вмерзанию токсичных веществ в лед и их вторичному поступлению в водную среду во время ледохода. Согласно китайским информационным источникам, загрязнение р. Сунгари поллютантами, аккумулированными в донных отложениях и во льду, было минимальным, а качество воды Сунгари во время таяния льда не ухудшилось [Environmental..., 2006; Li et al., 2008]. Однако по данным российских исследований, во льду р. Сунгари обнаружены токсичные хлорсодержащие вещества (хлороформ, четыреххлористый углерод), полициклические ароматические углеводороды, тяжелые металлы, различные производные бензола [Андрюченко и др., 2006].

Цель наших исследований состояла в анализе структуры криомикробиоценозов во льдах рек Амур и Сунгари и в определении их метаболической активности для оценки характера загрязнения водных экосистем в период формирования ледового покрова.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Река Амур замерзает в течение ноября, вскрывается в период с третьей декады апреля по первую декаду мая. В феврале–марте толщина льда на Амуре может достигать 2 м. В связи с тем, что р. Сунгари находится южнее, замерзает она с конца ноября, вскрывается в апреле. Толщина льда на Сунгари колеблется в пределах 0,8–1,3 м. Строение ледяного покрова р. Амур довольно разнообразно. В общем виде он состоит из смерзшихся шуги и торосов в верхних горизонтах, под которыми нарастают массивно-кристаллические льды, иногда формируются наледные льды [Иванов, 1998; Шестеркин и др., 2007].

Пробы льда для комплексных исследований р. Амур были отобраны в феврале 2006 г. по поперечному профилю реки на двух створах: с. Нижнеспасское и выше г. Хабаровска (рис. 1). Микро-



Рис. 1. Карта-схема мест отбора проб льда.

1 – населенные пункты; 2 – точки отбора проб льда; 3 – место аварии в ноябре 2005 г.

биологические исследования проводили только в нижнем слое льда (8–10 см), контактирующем с водой.

В марте 2006 г. во время совместного российско-китайского мониторинга пробы льда в р. Сунгари отбирали у левого и правого берегов выше городов Харбин, Цзямусы и Тунцзян. Микробиологические исследования льда р. Сунгари проводили послойно, толщина слоя в среднем составляла 20 см. Керны выпиливали кольцевым буром из ледяного массива, доставляли в лаборатории и растапливали при комнатной температуре.

Для биоиндикации загрязнения льдов органическими веществами различного происхождения, кроме общей численности гетеротрофных бактерий (ОЧГБ), использовали три физиологические группы бактерий, которые участвуют в самых важных процессах самоочищения водных экосистем. Аммонифицирующие (АМБ) и нитрифицирующие бактерии (НБ) последовательно осуществляют процессы аммонификации и нитрификации органических веществ. Фенолрезистентные и фенолоксиляющие бактерии (ФРБ/ФОБ) являются специализированной группой, используемой для биоиндикации загрязнения водных экосистем ароматическими углеводородами.

Определение численности отдельных физиологических групп КМЦ проводили путем посева 0,1 мл инокулята из расплава льда на агаризованные селективные среды методом предельных разведений с последующим пересчетом на 1 мл талой воды и выражали в колониеобразующих единицах (КОЕ/мл) [Кондратьева, 2000]. Численность АМБ определяли на рыбопептонном агаре; НБ учитывали на крахмал-аммиачном агаре (г/л): растворимый крахмал – 10,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,0, K_2HPO_4 – 1,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0, NaCl – 1,0, CaCO_3 – 3,0, агар-агар – 15,0; ФРБ/ФОБ культивировали на следующей среде (г/л): KNO_3 – 1,0, K_2HPO_4 – 1,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,02, NaCl – 1,0, фенол – 1,0, агар-агар – 20,0.

Потенциальную возможность криомикробоценозов разлагать легкодоступные и трудно минерализуемые органические вещества исследовали методом инициированных сообществ [Инкина, 1984]. Способность микроорганизмов трансформировать и утилизировать различные ОБ оценивали фотокolorиметрическим методом (КФК-56 М) по накоплению биомассы. В качестве показателя использовали изменение оптической плотности (ОП) при длине волны 490 нм или образование цветных продуктов в культуральной жидкости (КЖ).

Выбор источников углерода для оценки жизнеспособности микроорганизмов с использованием техники мультисубстратного тестирования зависит от поставленных задач. В работах, по-

священных оценке метаболической активности прокариотов, находящихся длительное время в состоянии криоконсервации, в качестве источника углерода используется глюкоза [Vorobyova et al., 1997]. Кроме глюкозы и пентона (0,2 %), в наших экспериментах были использованы ароматические соединения различной структуры: моноциклический фенол и полициклические ароматические углеводороды (бициклический нафталин и трициклический фенантрен) в концентрации 0,1 %. Эти вещества характерны для целого ряда промышленных сточных вод, в том числе нефтеперерабатывающих предприятий. Для культивирования микроорганизмов на ароматических углеводородах использовали минеральную среду М 9 следующего состава (г/л): KNO_3 – 1,33, K_2HPO_4 – 2,67, NH_4Cl – 1,0, Na_2SO_4 – 2,0, KNO_3 – 2,0, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1 [Кондратьева и др., 2009].

Культивирование проводили при температуре 22 °С для ускорения процесса ферментации субстрата. При изучении льдов в зависимости от поставленных задач применяются разные температурные режимы культивирования микроорганизмов. Так, для выявления филогенетического разнообразия и физиологической активности микроорганизмов из гренландских льдов использован широкий диапазон температур (2, 10, 18, 25, 29, 33 и 37 °С) [Miteva et al., 2004]. Инкубацию бактериальных штаммов, выделенных из зоны вечной мерзлоты, проводили при комнатной температуре [Vorobyova et al., 1997]. Для изучения биологических и молекулярных характеристик образцов льда была рекомендована температура 18–22 °С [Rogers et al., 2004], при которой активно развиваются различные группы психрофильных (криофильных) микроорганизмов.

Численность АМБ, НБ и ОЧГБ определяли на агаризованных средах через 7 суток культивирования, а группы ФРБ/ФОБ – через 30 сут. Интенсивность утилизации легкодоступных источников углерода микробными комплексами оценивали через 7 сут. Трансформацию ПАУ и утилизацию фенола определяли по накоплению биомассы и изменению цветности КЖ через 1 месяц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Численность и активность криомикробоценозов р. Амур. Впервые биоиндикационная роль криомикробоценозов определена в результате оценки трансграничного загрязнения р. Амур в период ледостава 2000–2001 гг. В нижнем слое льда, контактирующем с водой, были обнаружены представители разных физиологических групп микроорганизмов (табл. 1). Их численность изменялась в зависимости от различных факторов: места отбора проб льда (расстояние от берега), развития во-

Таблица 1. Структура криомикробиоценозов р. Амур выше (с. Нагибово) и ниже устья р. Сунгари (с. Ленинское, с. Нижнеспасское) в период ледостава 2000/2001 г.

Место отбора проб, м от левого берега	Численность эколого-трофических групп бактерий, КОЕ/мл расплава льда			
	ОЧГБ	АМБ	НБ	ФРБ/ФОБ
<i>Нагибово</i>				
100	90	110	90	Нет
150	40	120	90	55
300 (загрязнение нефтью)	1 220 000	650 000	940 000	380
<i>Ленинское</i>				
250	110	30	130	Нет
440	220	35	200	Нет
550 (примеси угольной пыли)	810	110	260	80
<i>Нижнеспасское</i>				
50	160	120	130	70
250 (среди торосов)	930	490	1100	490
250 (с водорослями)	270	125	225	70

дорослей, присутствия токсичных микропримесей, включая локальное антропогенное загрязнение нижней поверхности льда нефтепродуктами. Характер загрязнения льда существенно различался на разных участках реки, в том числе под влиянием стока р. Сунгари.

Загрязнение контактной зоны вода–лед нефтепродуктами на одном из обследованных створов р. Амур спровоцировало значительное увеличение численности всех индикаторных групп бактерий. В присутствии тонкодисперсных частиц угля и детрита во льдах также наблюдался рост численности КМЦ до 10 раз. Существенное изменение численности микроорганизмов во льдах Амура по направлению от левого берега к фарватеру обнаружено ниже впадения Сунгари.

Максимальное увеличение численности КМЦ отмечено в 550 м от российского берега, где происходит смешение амурских и сунгарийских вод. Особенно высокой была численность группы бактерий, утилизирующих азотсодержащие ОВ. Этот факт свидетельствовал о поступлении в р. Амур с китайской территории неочищенных коммунальных сточных вод, обогащенных биогенными элементами, органическими веществами и продуктами их разложения.

Многочисленные исследования льда в период ледостава 2002 г. в районе г. Хабаровска показали, что самый “чистый” (по микробиологическим показателям) лед был отобран в феврале. К концу зимы зарегистрировано увеличение загрязнения

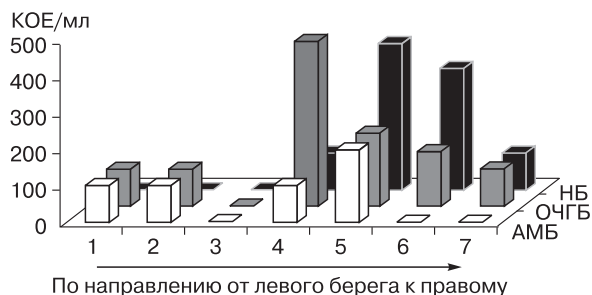


Рис. 2. Численность физиологических групп криомикробиоценозов в пробах нижнего слоя льда р. Амур в районе с. Нижнеспасское в феврале 2006 г.

1, 2 – левый берег; 3–5 – середина реки; 6, 7 – правый берег. АМБ – аммонифицирующие бактерии; НБ – нитрифицирующие бактерии; ОЧГБ – общая численность гетеротрофных бактерий.

льдов органическими веществами различного происхождения. Численность индикаторных групп бактерий возросла в 4–8 раз, в том числе фенолрезистентных бактерий – в 7 раз [Konratjeva, 2004].

Микробиологические исследования льда Амура, проведенные в феврале 2006 г., показали, что в районе с. Нижнеспасское распространение загрязняющих веществ проходило вдоль правого берега и на середине реки. Об этом свидетельствует более высокая, чем у левого берега, численность микроорганизмов, развивающихся в контактной зоне вода–лед (рис. 2). Необходимо отметить, что бактерии – индикаторы фенольного загрязнения во льду у левого берега отсутствовали. У правого берега численность группы ФРБ/ФОБ была довольно низкой – 10 КОЕ/мл и только на середине реки составляла 6110 КОЕ/мл. Данный факт свидетельствует о том, что нижние слои льда у берегов могут находиться в контакте с придонными водами с высоким содержанием азотсодержащих ОВ, а фенольные соединения распространяются главным образом с водными массами посередине реки. В районе г. Хабаровска в нижнем слое льда криомикробиоценозы были малочисленными и равномерно распределены по поперечному профилю реки. Эти данные согласуются с ранее полученными результатами изучения контактной зоны вода–лед.

Экспериментальные исследования показали, что микробиоценозы нижней поверхности льда Амура, отобранного у левого берега, отличались низкой активностью по отношению к разным источникам углерода. Это связано со слабым загрязнением льда и воды вдоль российского берега. На середине реки в районе с. Нижнеспасское была установлена повышенная активность КМЦ по отношению к легкодоступным ОВ (рис. 3, а). Так,

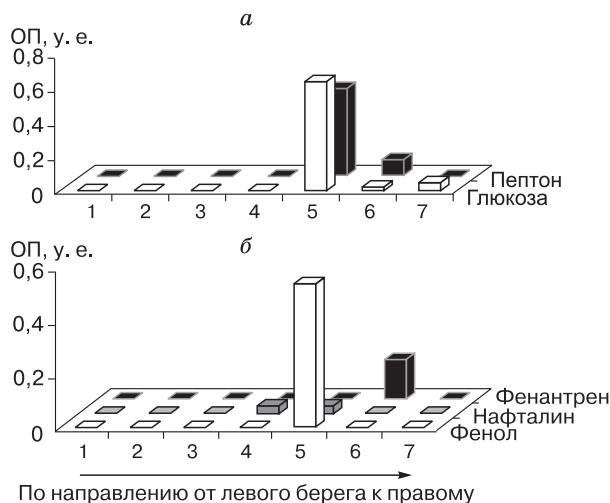


Рис. 3. Активность криомикробов р. Амур в пробах льда, отобранных в районе с. Нижне-спасское в феврале 2006 г.

1, 2 – левый берег; 3–5 – середина реки; 6, 7 – правый берег. ОП – оптическая плотность при длине волны 490 нм.

криомикробы из этого местообитания сбраживали глюкозу и утилизировали азотсодержащие ОВ с активным газообразованием. Ниже по течению у правого берега активность микроорганизмов по отношению к легкодоступным ОВ снижалась. Потенциальная активность микробных комплексов льда при трансформации моно- и полициклических ароматических углеводородов была невысокой и также отмечалась только во льду, отобранном ближе к правому берегу (см. рис. 3, б). Во льдах, отобранных у правого берега в районе с. Нижне-спасское, несмотря на низкую численность группы ФРБ/ФОБ, криомикробы проявляли высокую активность по отношению к фенолу. Они интенсивно накапливали биомассу и образовывали цветные продукты. Планктонные микробы в подледной воде, отобранной в этом месте и в то же время, также проявляли максимальную активность по отношению к фенолу [Кондратьева и др., 2009].

Исследования активности микробов льда р. Амур выше устья р. Сунгари (с. Амурзет) показали, что загрязняющие вещества поступают не только со стоком р. Сунгари, но и с расположенных выше участков со сточными водами населенных пунктов на правом китайском берегу. Активность КМЦ по отношению к ПАУ у правого берега была выше, чем на середине реки (рис. 4), особенно по отношению к нафталину.

Таким образом, исследования численности и активности криомикробов р. Амур показали, что загрязнение нижней поверхности льда легкодоступными ОВ, моно- и полициклическими

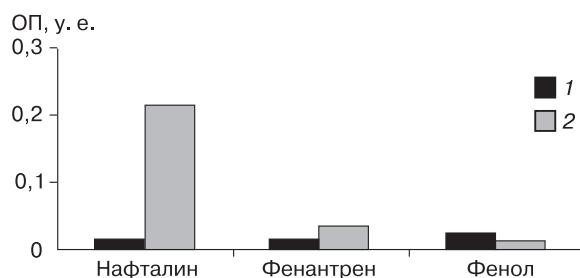


Рис. 4. Активность криомикробов р. Амур в пробах льда, отобранных выше устья р. Сунгари (с. Амурзет) в феврале 2006 г.

1 – середина реки; 2 – правый берег.

ароматическими веществами в феврале 2006 г. было незначительным. Как правило, в это время отмечается минимальное загрязнение воды, что находит свое отражение в состоянии микробных комплексов в контактной зоне вода–лед. Учитывая структуру, активность микробов воды и нижних слоев льда, можно сказать, что под влиянием стока р. Сунгари происходит загрязнение р. Амур вдоль правого берега азотсодержащими ОВ и ароматическими углеводородами, содержащимися в недостаточно очищенных хозяйственно-бытовых и промышленных стоках.

Послойное исследование численности и активности криомикробов р. Сунгари. Для оценки последствий техногенной аварии в г. Цзиллине в рамках российско-китайского мониторинга в марте 2006 г. было проведено послойное исследование льда р. Сунгари. В некоторых слоях льда отмечена чрезвычайно высокая численность исследованных физиологических групп бактерий и активность криомикробов, свидетельствующая о концентрировании различных ОВ, поступающих со сточными водами населенных пунктов и промышленных предприятий, расположенных в провинции Хэйлуцзян.

В районе г. Харбина нитробензолное загрязнение проходило преимущественно вдоль правого берега, когда лед на р. Сунгари только начал формироваться. Максимальная численность криомикробов во всех слоях льда отмечена у левого берега (табл. 2). Особенно многочисленной была группа ФРБ/ФОБ (8740 КОЕ/мл) в слое льда 20–40 см. Это свидетельствует о том, что возле левого берега в течение всего периода формирования ледового покрова перемещались водные массы, интенсивно загрязненные азотсодержащими и фенольными соединениями, поступление которых в р. Сунгари не было связано с техногенной аварией. Различий в содержании ОВ, определяемых по интегральному показателю (химическое потреб-

Таблица 2. Численность физиологических групп криомикробоценозов (КОЕ/мл) во льду р. Сунгари в марте 2006 г.

Место отбора проб		Слой, см	АМБ	ОЧГБ	НБ	ФРБ/ФОБ
г. Харбин	Левый берег	0–20	300	1200	250	100
		20–40	15 000	32 000	20 000	8740
		40–60	4333	23 000	8000	245
		60–80	100	1500	0	0
	Правый берег	0–20	6333	4667	2333	607
		20–40	0	100	20	0
		40–60	300	0	0	10
	60–80	1000	100	0	1270	
г. Цзямусы	Левый берег	20–40	0	0	0	0
		40–68	0	–	100	0
		68–76	0	300	0	0
	Правый берег	0–20	19 000	43 350	40 600	2400
		20–40	423 000	1 752 000	320 000	48 000
		59–75	1700	1000	300	60
г. Тунцзян	Левый берег	0–20	100	150	600	50
		80–100	200	150	450	20
	Правый берег	0–20	30 700	34 150	98 200	7820
		46–69	100	450	350	0

Примечание. Прочерк – данные отсутствуют.

ление кислорода – ХПК), на данном участке реки во льдах не обнаружено [Левшина, 2007]. Однако микробиологическими методами были получены данные, отражающие различный качественный состав загрязняющих веществ, распространяющихся вдоль берегов, и неоднородность загрязнения водных масс при формировании льдов как в пространстве, так и во времени. Наиболее существенные различия в структуре КМЦ у берегов выше г. Харбин отмечены в верхнем (0–20 см) слое льда.

Микробиологические исследования льда выше г. Цзямусы позволили выявить чрезвычайно высокую численность исследуемых физиологических групп бактерий у правого берега (см. табл. 2). Максимальная их численность отмечена в слое льда 20–40 см, который образовался во время прохождения нитробензольного загрязнения, расплав льда был мутным с резким запахом. Особенно высокой была численность индикаторов фенольного загрязнения. В этом слое льда отмечено максимальное содержание органических веществ по ХПК (О до 40 мг/л) [Левшина, 2007], большие концентрации аммонийного азота – 0,093 мг/л и фосфатов – 0,180 мг/л [Шестеркин и др., 2007]. У левого берега в районе г. Цзямусы в таком же слое льда культивируемые бактерии отсутствовали. На этом участке реки нитробензольное загрязнение проходило преимущественно вдоль правого берега и не достигало левого.

В низовье р. Сунгари в районе г. Тунцзян численность КМЦ во льдах оставалась максимальной

у правого берега. Это связано с прохождением загрязненных водных масс после техногенной аварии на участке реки Цзямусы–Тунцзян преимущественно вдоль правого берега. Численность бактерий-индикаторов фенольного загрязнения составляла 7820 КОЕ/мл и была сопоставимой с их количеством на вышерасположенном участке.

Экспериментальные исследования показали, что во всех слоях льда р. Сунгари криомикробоценозы активно утилизировали легкодоступные ОВ (пептон и глюкозу) (рис. 5). Активность КМЦ была сопоставима с активностью бактериопланктона в пробах воды, отобранных в тот же период. Эти данные свидетельствуют о хроническом загрязнении р. Сунгари органическими веществами различного происхождения в течение всего периода ледостава. В районе г. Цзямусы максимальная микробиологическая активность по отношению к глюкозе и пептону отмечена у правого берега, особенно в слое льда 20–40 см, в котором концентрировались все вещества, поступившие во время аварии и при разбавлении водами из водохранилища. В низовье р. Сунгари в районе г. Тунцзян микробные комплексы из верхних слоев льда у обоих берегов активно утилизировали глюкозу и пептон. Это может быть обусловлено загрязнением воды хозяйственно-бытовыми стоками в период начального формирования льда.

Исследования активности КМЦ по отношению к фенолу, нафталину и фенантрону показали, что воды р. Сунгари в течение зимнего периода

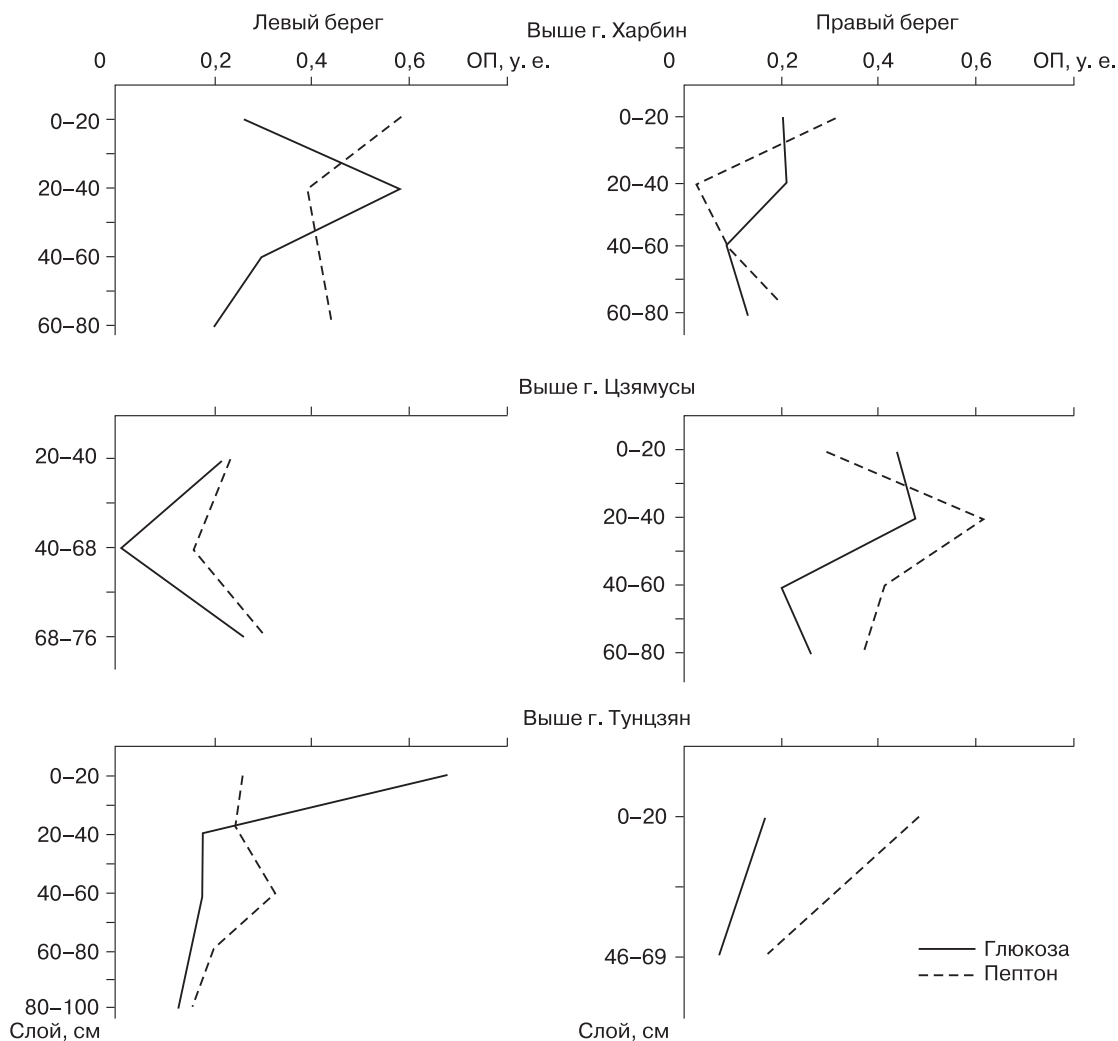


Рис. 5. Активность роста криомикробсоценозов р. Сунгари на глюкозе и пептоне через 7 суток культивирования (при длине волны 490 нм).

были загрязнены не только лабильными ОВ, но и токсичными моно- и полициклическими ароматическими углеводородами. Высокую активность по отношению к фенолу проявляли КМЦ из тех же слоев льда, где была зарегистрирована максимальная численность ФРБ/ФОБ (рис. 6). Исключением стали КМЦ из верхнего слоя льда (0–20 см), отобранного у левого берега в низовье р. Сунгари. В нем, несмотря на низкую численность индикаторной группы бактерий (ФРБ/ФОБ), криомикробсоценозы обладали высокой активностью по отношению к фенолу и накапливали в культуральной жидкости метаболиты желтого цвета. Известно, что в процессе разрыва фенольного кольца некоторые микроорганизмы образуют 2-гидроксимуконный полуальдегид, у которого желтый цвет [Molin, Nilsson, 1985].

Криомикробсоценозы из слоя льда 20–40 см, отобранного у правого берега выше г. Цзямусы, уже на третьи сутки культивирования на феноле накапливали биомассу и образовывали метаболиты, меняющие цветность КЖ до ярко-коричневой. Известно, что при трансформации фенола может образовываться *p*-нитрозофенол, который в присутствии нитрата образует коричневый или красный осадок. Как сказано выше, в данном слое льда была выявлена чрезвычайно высокая численность аммонифицирующих и нитрифицирующих бактерий, участвующих в деструкции азотсодержащих ОВ до аммония и нитратов. В силу проявленной активности можно предположить, что в данном слое льда могли происходить микробиологические процессы с образованием нитрозофенола.

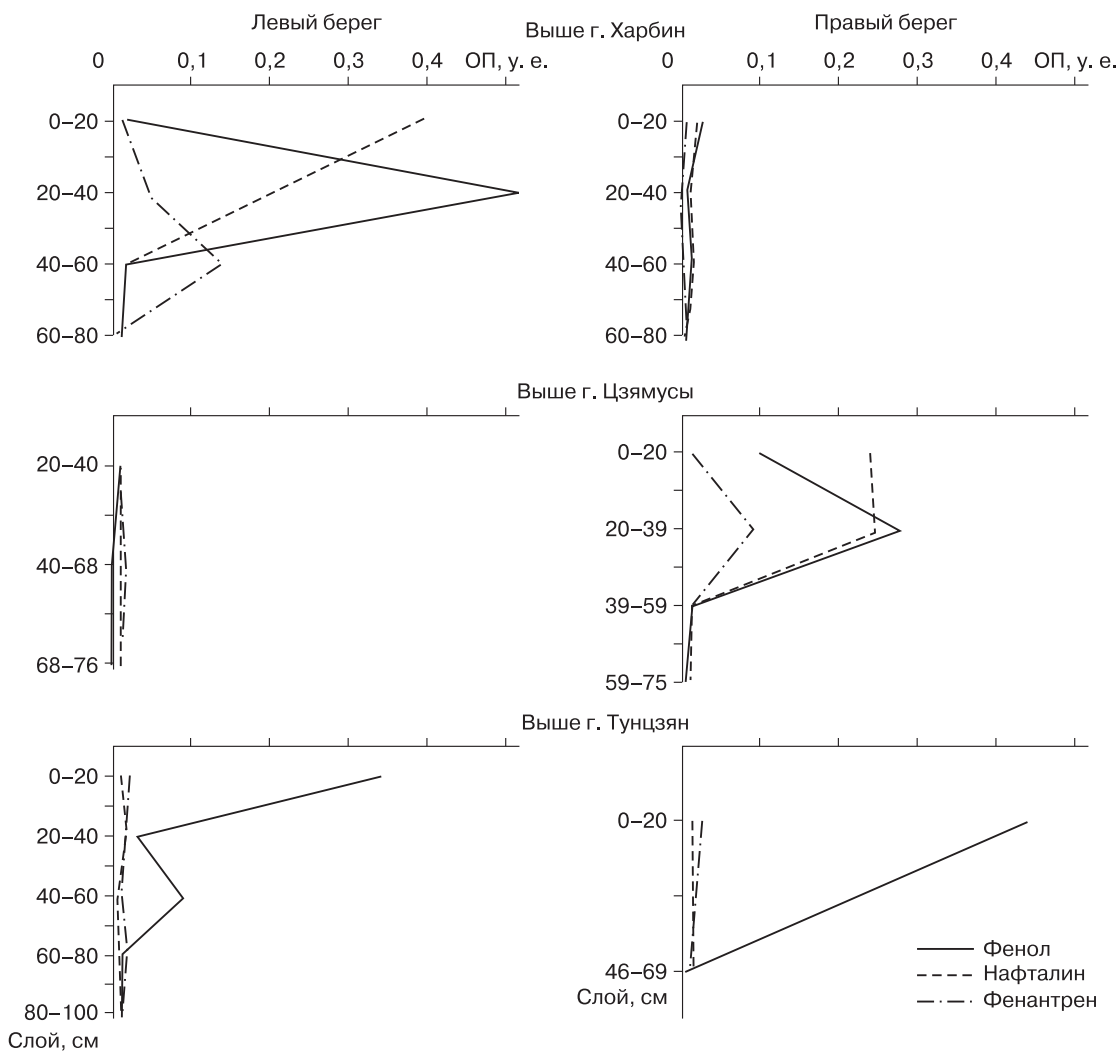


Рис. 6. Активность роста криомикробоценозов р. Сунгари на ароматических углеводородах через 30 суток культивирования (при длине волны 490 нм).

Нафталин и фенантрен плохо растворимы в воде (30,6 и 1,2 мг/л соответственно), поэтому одна часть сообщества микроорганизмов развивалась за счет растворимой составляющей субстрата, а другая – в виде биопленок на частицах этих углеводородов. По отношению к нафталину высокая активность микробоценозов была характерна для верхних слоев льда, отобранного у левого берега выше г. Харбин и у правого берега выше г. Цзямусы (см. рис. 6). Через три месяца культивирования КМЦ из льдов, отобранных выше Харбина, нафталин практически полностью растворялся, в КЖ накапливались интермедиаты желтого цвета. Криомикробоценозы из льда, отобранного у правого берега выше г. Цзямусы, менее интенсивно накапливали биомассу, но значительно активней трансформировали нафталин, изменяя цветность КЖ до темно-бурой. Известно, что при микробио-

логической трансформации нафталина могут образовываться вещества, относящиеся к группе нафтола и нафтохинона, которые в щелочной среде приобретают красновато-коричневый цвет [Cerniglia, Gibson, 1977]. Разнообразные формы хинонов встречаются при исследовании механизмов трансформации других представителей ПАУ, когда на завершающих этапах образуются производные нафталина [Jacob, 2008].

По отношению к фенантрону криомикробоценозы проявляли меньшую активность, чем к нафталину. Однако повышение их активности отмечалось на тех же участках р. Сунгари, где была зарегистрирована интенсивная трансформация нафталина (см. рис. 6), в этих образцах также накапливались цветные продукты трансформации, аналоги нафтохинонов или хинонов. Установлено, что механизмы трансформации нафталина и фе-

нантрена могут осуществляться при участии одних и тех же генов, кодируемых плазмидами, с образованием похожих по структуре интермедиатов [Sanseverino et al., 1993].

Хотя в многочисленных обзорах по биодеградации ПАУ рассматриваются механизмы их трансформации при участии различных представителей бактерий и микроскопических грибов, обитающих в почвах, воде и донных отложениях [Ri-He Peng et al., 2008; Haritash, Kaushik, 2009], отдельно их поведение во льдах не обсуждается. Однако было показано, что температура напрямую не влияет на поведение ПАУ в компонентах окружающей среды. Объективными факторами выступают присутствующие растворенные органические вещества, природные сорбенты и гидрофобность самих ПАУ. Поэтому механизмы трансформации этой группы поллютантов специфичны для каждого местообитания [Haftka et al., 2010] и зависят от комплекса факторов окружающей среды и биохимических процессов, обусловленных микробным метаболизмом.

Сравнительный анализ активности планктонных сообществ и криомикробоценозов через месяц культивирования на моно- и полициклических ароматических углеводородах показал, что в большинстве проб криомикробоценозы проявляли меньшую активность, чем планктонные сообщества. Тем не менее самую высокую активность по отношению к фенолу, нафталину и фенантрону проявляли КМЦ из наиболее загрязненного слоя льда (20–40 см), отобранного у правого берега выше г. Цзямусы.

Таким образом, методом микробиологической индикации на реках Амур и Сунгари были выявлены локальные зоны с хроническим загрязнением воды и льда моно- и полициклическими ароматическими углеводородами. Судя по характеру загрязнения льдов р. Сунгари, высокий уровень фенольного загрязнения чаще всего отмечается в низовье в районе г. Тунцзян, что определяет регулярное трансграничное поступление ароматических соединений в р. Амур с сунгарийскими водами.

Проведенное послыжное исследование льдов позволило оценить характер загрязнения воды р. Сунгари на различных участках после техногенной аварии, во время прохождения нитробензольного загрязнения и в течение всего периода ледостава. Исследование численности и активности криомикробоценозов во льдах у разных берегов показало, что после техногенной аварии загрязняющие вещества распределялись по профилю реки неравномерно. Основная масса поллютантов перемещалась с водными массами преимущественно вдоль правого берега, среди них доминирующее положение занимали ароматические углеводоро-

ды различного строения и стабильности, а не только нитробензол, который быстро подвергался микробиологической трансформации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В речном льду, несмотря на экстремальные условия существования (высокая плотность льда, низкая температура), жизнеспособные гетеротрофные микроорганизмы проявляют метаболическую активность по отношению к лабильным и стойким ароматическим углеводородам.

Микробиологические исследования льда в реках Амур и Сунгари после техногенной аварии на нефтехимическом заводе в Китае показали, что лед концентрирует органические вещества, которые в период льдообразования находятся в воде. Затем эти поллютанты подвергаются трансформации и деструкции сложными микробными комплексами – криомикробоценозами.

Послыжное исследование КМЦ позволяет сделать ретроспективный анализ загрязнения водных масс в течение ледостава. Полученные сведения о характере послыжного распределения загрязняющих веществ служат основой для смены методологии мониторинга в зимнее время. В зимний период при изучении качества воды в разных типах водных экосистем (реки, озера, водохранилища) лед может служить показательным объектом для выявления не зафиксированных экологическими службами аварийных выбросов и оценки характера распределения загрязняющих веществ в пространстве и во времени.

Проведенные исследования показали, что криомикробоценозы могут быть использованы в качестве биоиндикаторов загрязнения водных экосистем во время ледостава органическими веществами, включая ароматические углеводороды различного строения. Проверка потенциальной активности криомикробоценозов на конкретных субстратах позволяет прогнозировать загрязнение воды в весенний период этими веществами и продуктами их трансформации, образующимися при низких температурах.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института водных и экологических проблем ДВО РАН В.П. Шестеркину и В.И. Киму, а также всем сотрудникам УГМС г. Хабаровска, принимавшим участие в отборе проб воды и льда в реках Амур и Сунгари в экстремальных условиях.

Литература

Андрienko С.Н., Бардюк В.В., Веселовская О.В. О реализации комплексных мер по обеспечению экологической безопасности населения Российского Приамурья // Материалы Междунар. науч.-практ. конф. в области экологии и безопасности жизнедеятельности. Комсомольск н/А, КнАГТУ, 2006, с. 10–15.

- Баулин В.В., Ершов Э.Д., Конищев В.Н. и др.** Результаты и задачи геокриологических исследований в России // Криосфера Земли, 2006, т. X, № 1, с. 3–10.
- Бердников Н.В., Рапопорт В.Л., Рыбас О.В. и др.** Мониторинг загрязнения экосистемы р. Амур в результате аварии на химическом заводе в г. Цзилинь (КНР): нитробензол // Тихоокеан. геология, 2006, т. 25, № 5, с. 94–103.
- Иванов А.В.** Криогенная метаморфизация химического состава природных льдов, замерзающих и талых вод. Хабаровск; Владивосток, Дальнаука, 1998, 164 с.
- Иванов А.В., Юрьев Д.Н., Лебедев Ю.М.** Криоперифитон в ледяном покрове р. Амур // Материалы гляциохим. исслед., 1987, вып. 60, с. 184–189.
- Ивашов П.В.** Значение диатомовых водорослей в индикации качества воды реки Амур // Биогеохимические и экологические оценки техногенных экосистем бассейна реки Амур. Владивосток, Дальнаука, 1994, с. 170–173.
- Инкина Г.А.** Гетеротрофная активность бактериопланктона как показатель самоочистительной способности вод // Экологические аспекты водной микробиологии. Новосибирск, Наука, 1984, с. 99–103.
- Израэль Ю.А.** Динамика экосистем Берингова и Чукотского морей / Ю.А. Израэль, А.В. Цыбань, Дж. Грейбмайер и др. М., Наука, 2000, 357 с.
- Кондратьева Л.М.** Микроорганизмы в экосистемах Приамурья / Л.М. Кондратьева, Л.А. Гаретова, Е.Л. Имранова и др. Владивосток, Дальнаука, 2000, 198 с.
- Кондратьева Л.М.** Микробоценозы криосферы – индикаторы антропогенного загрязнения водных экосистем // Современные проблемы биоиндикации и биомониторинга: Тезисы Междунар. симп. по биоиндикаторам. Сыктывкар, 2001, с. 82–83.
- Кондратьева Л.М.** Лед как компонент мониторинга загрязнения поверхностных вод // Тр. Междунар. конф. “ENVIROMIS-2002”. Томск, Изд-во ГУ Томский ЦНТИ, 2002, т. 1, с. 174–179.
- Кондратьева Л.М.** Геоэкологические исследования речного льда // Геоэкология, 2010, № 6, с. 511–520.
- Кондратьева Л.М., Фишер Н.К., Бердников Н.В.** Микробиологическая оценка качества воды в реках Амур и Сунгари после техногенной аварии в Китае // Вод. ресурсы, 2009, т. 36, № 5, с. 575–587.
- Лебедев Ю.М., Сиротский С.Е., Юрьев Д.Н.** Зимний фотосинтез в р. Амур и развитие водорослей в связи с подледными световыми условиями // Круговорот вещества и энергии в водоемах. Иркутск, ИГУ, 1981, вып. 1, с. 88–89.
- Левшина С.И.** Содержание и динамика органического вещества в водах Амура и Сунгари // География и природ. ресурсы, 2007, № 2, с. 44–51.
- Могильникова Т.А., Полтева А.В., Латковская Е.М. и др.** Микроводоросли и гетеротрофные бактерии льда и подледной воды: условия их развития в прибрежных акваториях острова Сахалин // Экологические аспекты освоения нефтегазовых месторождений: Сб. Владивосток, Дальнаука, 2009, № 1, с. 129–145.
- Немировская И.А.** Углеводороды в океане (снег–лед–водоносные осадки). М., Науч. мир, 2004, 328 с.
- Немировская И.А., Новигатский А.Н.** Углеводороды в снежно-ледяном покрове и водах Северного Ледовитого океана // Геохимия, 2003, № 3, с. 651–660.
- Шестеркин В.П., Шестеркина Н.М., Форина Ю.А., Ри Т.Д.** Трансграничное загрязнение Амура в зимнюю межень 2005–2006 гг. // География и природ. ресурсы, 2007, № 2, с. 40–44.
- Юрьев Д.Н.** Речной лед как субстрат для развития планктонных водорослей // Эколого-биогеохимические исследования на Дальнем Востоке. Владивосток, Дальнаука, 1996, вып. 1, с. 79–96.
- Brinkmeyer R., Knittel K., Jürgens J. et al.** Diversity and structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic pack ice // Appl. Environ. Microbiol., 2003, vol. 69, No. 11, p. 6610–6619.
- Cerniglia C.E., Gibson D.T.** Metabolism of naphthalene by *Cunninghamella elegans* // Appl. Environ. Microbiol., 1977, vol. 34, No. 4, p. 363–370.
- Davenport C.V., Sparrow E.B., Gordon R.C.** Fecal indicator bacteria persistence under natural conditions in an ice-covered river // Appl. Environ. Microbiol., 1976, vol. 32, No. 4, p. 527–536.
- D’Elia T., Ram Veerapaneni R., Rogers S.O.** Isolation of microbes from Lake Vostok accretion ice // Appl. Environ. Microbiol., 2008, vol. 74, No. 15, p. 4962–4965.
- Environmental Protection Administration of Heilongjiang Province / Rep. State Environ. Heilongjiang Province, 2006.** (http://english.mep.gov.cn/standards_reports/soe/SOE2006/200711/t20071105_112567.htm).
- Foght J., Aislabie J., Turner S. et al.** Culturable bacteria in subglacial sediments and ice from two Southern Hemisphere glaciers // Microbiol. Ecol., 2004, vol. 47, No. 4, p. 329–340.
- Garrison D.L., Gibson A., Coale S.L. et al.** Sea-ice microbial communities in Ross Sea: autumn and summer biota // Marine Ecol. Progress Ser., 2005, vol. 300, No. 16, p. 39–52.
- Haftka J.J., Govers H.A., Parsons J.R.** Influence of temperature and origin of dissolved organic matter on the partitioning behavior of polycyclic aromatic hydrocarbons // Environ. Sci. Pollut. Res. Intern., 2010, vol. 17, No. 5, p. 1070–1079.
- Haritash A.K., Kaushik C.P.** Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review // J. Hazard Mater., 2009, vol. 169, No. 1–3, p. 1–15.
- Hullar M.A.J., Kaplan L.A., Stahl D.A.** Recurring seasonal dynamics of microbial communities in Stream Habitats // Appl. Environ. Microbiol., 2006, vol. 72, No. 2, p. 713–722.
- Jacob J.** The significance of polycyclic aromatic hydrocarbons as environmental carcinogens. 35 years research on PAH – a retrospective // Polycyclic Aromatic Compounds, 2008, vol. 28, No. 4–5, p. 242–272.
- Kitajima M., Oka T., Haramoto E. et al.** Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan // Appl. Environ. Microbiol., 2010, vol. 76, No. 8, p. 2461–2467.
- Kondratjeva L.M.** Combined methods for Amur river pollution assessment. Ecosystem approach // Rep. on Amur – Okhotsk Project: Proc. of the Kyoto Workshop. Kyoto, Res. Inst. for Humanity and Nature, 2004, No. 2, p. 47–65.
- Li D., Yang M., Li Z. et al.** Change of bacterial communities in sediments along Songhua River in Northeastern China after a nitrobenzene pollution event // FEMS Microbiol. Ecol., 2008, vol. 65, No. 3, p. 494–503.
- Matoba S., Sasaki H., Shiraiwa T.** Iron flux over the subarctic pacific estimated by an ice-core record from Mount Wrangell, Alaska // Rep. on Amur – Okhotsk Project. Kyoto, Res. Inst. for Humanity and Nature, 2008, No. 5, p. 183–187.

- Miteva V.I., Sheridan P.P., Brenchley J.E.** Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland glacier ice core // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, vol. 70, No. 1, p. 202–213.
- Molin G., Nilsson I.** Degradation of phenol by *Pseudomonas putida* ATCC 11172 in continuous culture at different ratios of biofilm surface to culture volume // *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, vol. 50, No. 4, p. 946–950.
- Nishino S.F., Spain J.C.** Degradation of nitrobenzene by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* // *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, vol. 59, p. 2520–2525.
- Park H.S., Kim M.** Identification and characterization of the nitrobenzene catabolic plasmids pNB1 and pNB2 in *Pseudomonas putida* HS12 // *J. Bacteriol.*, 2000, vol. 182, p. 573–580.
- Polteva A.V., Pishchalnik V.M.** Oil-oxidizing microorganisms in sea ice and under-ice water in the southern Sakhalin coastal zone // *Proc. of the 22d Intern. Symp. on Okhotsk Sea and sea ice (Mombetsu, Hokkaido, Japan, 18–21 Febr. 2007)*. Mombetsu, 2007, p. 155–157.
- Ri-He Peng, Ai-Sheng Xiong, Yong Xue et al.** Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons // *FEMS Microbiol. Rev.*, 2008, vol. 32, No. 6, p. 927–955.
- Rogers S.O., Theraisnathan V., Ma L.J. et al.** Comparisons of protocols to decontaminate environmental ice samples for biological and molecular examinations // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, vol. 70, No. 4, p. 2540–2544.
- Roldan M.D., Perez-Reinado E., Castillo F., Moreno-Vivian C.** Reduction of polynitroaromatic compounds the bacterial nitroreductases // *FEMS Microbiol. Rev.*, 2008, vol. 32, No. 3, p. 474–500.
- Sanseverino J., Applegate B.M., King J.M., Sayler G.S.** Plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene, and anthracene // *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, vol. 59, No. 6, p. 1931–1937.
- Somerville C.C., Nishino S.F., Spain J.C.** Isolation and characterization of nitrobenzene nitroreductase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 // *J. Bacteriol.*, 1995, vol. 177, p. 3837–3842.
- The Songhua** River spill. Field mission report. United Nat. Environ. Program. China, Dec. 2005, 26 p.
- Vorobyova E., Soina V., Gorlenko M. et al.** The deep could biosphere: facts and hypothesis // *FEMS Microbiol. Rev.*, 1997, vol. 20, p. 277–290.

Поступила в редакцию
10 июня 2010 г.