

УДК 504.72

## ЭКОЛОГО-ТРОФИЧЕСКИЙ СОСТАВ БАКТЕРИОЦЕНОЗА РОДНИКА АРАПОВ КЛЮЧ КАК ИНДИКАТОР НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Егорова Д.О.

*Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь,  
e-mail: daryao@rambler.ru*

Состав и структура биоценоза являются одними из маркеров экологического благополучия. Анализ эколого-трофических групп каждого компонента биоценоза (зооценоза, фитоценоза, микробиоценоза) используется в мониторинге при оценке воздействия поллютантов на биотический компонент ценоза. Подземные воды являются уникальными геолого-биологическими системами. При этом микробиоценозы подземных вод являются чувствительными к любым видам загрязнения, в том числе к нефтяным углеводородам. В настоящем исследовании методами классической микробиологии установлено соотношение основных эколого-трофических групп аэробных бактерий в составе микробиоценоза подземных вод родника «Арапов ключ». Отбор образцов воды родника производили в весеннее половодье и летнюю межень полевых сезонов 2016–2017 гг. Анализировали количественные показатели трех эколого-трофических групп бактерий: гетеротрофных, нефтеокисляющих и галофильных. Установлено, что группа галофильных бактерий присутствовала в водах родника только в 2017 г., тогда как остальные группы были обнаружены в образцах всего периода исследования. На основании полученных результатов можно делать предположение о наличии негативного влияния нефтяного загрязнения на бактериоценоз родника. При этом уровень влияния позволяет микробиоценозу за счет флуктуационных изменений поддерживать целостность и стабильность системы биоценоза подземных вод родника Арапов ключ.

**Ключевые слова:** микробиоценоз, родник, нефтяное загрязнение, эколого-трофические группы

## ECOLOGICAL AND TROPHIC COMPOSITION OF BACTERIOCENOSIS OF THE ARAPOV KLUCH SPRING AS AN INDICATOR OF OIL POLLUTION

Egorova D.O.

*Perm State University, Perm, e-mail: daryao@rambler.ru*

The composition and structure of the biocenosis are among the markers of ecological well-being. The analysis of the ecological-trophic groups of each component of the biocenosis (zoocenosis, phytocenosis, microbiocenosis) is used in monitoring when assessing the effect of pollutants on the biotic component of cenosis. Groundwater is a unique geological and biological systems. At the same time, microbiocenoses of groundwater are sensitive to any types of pollution, including petroleum hydrocarbons. In the present study, the ratio of the main ecological-trophic groups of aerobic bacteria as a part of the groundwater microbiocenosis of the spring «Arapov Klyuch» was determined by the methods of classical microbiology. Sampling of spring water was carried out in the spring tide and summer low water period of the field seasons 2016-2017. Analyzed the quantitative indicators of the three ecological and trophic groups of bacteria: heterotrophic, oil-oxidizing and halophilic. It was established that a group of halophilic bacteria was present in the spring waters only in 2017, while the other groups were found in samples from the entire study period. On the basis of the obtained results, it is possible to make an assumption about the presence of a negative effect of oil pollution on the bacteriocenosis of the spring. At the same time, the level of influence allows microbocenosis to maintain the integrity and stability of the groundwater biocenosis system of the Arap spring key due to fluctuation changes.

**Keywords:** microbiocenosis, spring, oil pollution

Биологический мониторинг – система наблюдения, прогноза и оценки любых изменений в биотических компонентах, вызванных антропогенным воздействием [1, 2]. Неотъемлемой частью биологического мониторинга является микробиологическая оценка состояния природных сред. Микроорганизмы – общепризнанные индикаторы состояния почв, донных осадков, поверхностных и подземных вод.

Отражением антропогенного воздействия служат морфологические изменения микробных популяций, кинетика их роста и развития, структурные преобразования микробных сообществ, биохимическая активность. Микробные реакции на воздействие антропогенного фактора проявляются

быстро, достаточно отчетливо, что позволяет в короткие сроки выявить наиболее ранние экологические зоны, прогнозировать их состояние при сохранении или устранении антропогенного воздействия.

В природных водоемах бактерии выступают в качестве агентов, осуществляющих разложение органических соединений природного и антропогенного происхождения. В случае загрязнения водного объекта нефтью и/или нефтепродуктами преимущественное развитие получают специфические эколого-трофические группы микроорганизмов, использующие в процессе жизнедеятельности углеводороды нефти. На этом явлении основаны приемы микробиологической индикации нефтяного загрязнения водной среды [3].

Микробное сообщество – сложная система, которая в рамках мониторинга может рассматриваться с точки зрения функциональной, морфологической, таксономической и экологической структуры. При мониторинге с целью выявления нефтяного загрязнения наиболее актуальным является рассмотрение основных эколого-трофических групп микроорганизмов, представленных в потенциально загрязняемом объекте.

Известно, что нефтяное загрязнение оказывает комплексное воздействие на окружающую среду и вызывает ее быструю отрицательную реакцию [4, 5]. Хронические разливы нефти, нефтепродуктов, соленых пластовых вод, выносимых эксплуатационными скважинами вместе с нефтью и газом, приводят к уменьшению продуктивности земель и деградации ландшафтов. Однако низкие концентрации нефти и ее компонентов могут оказывать стимулирующее действие на биоту, являясь энергетическим и пластическим субстратом. Длительное воздействие нефти на бактериоценоз приводит к изменениям в структуре и свойствах микробного и, в частности, бактериального, сообщества. Начинают доминировать специализированные формы микроорганизмов, способные окислять твердые парафины, газообразные углеводороды, ароматические углеводороды.

Изменения, происходящие при различном уровне нефтяного загрязнения:

1. Низкому уровню загрязнения соответствуют флуктуационные изменения микробной системы, затрагивающие интенсивность микробиологических процессов.

2. Средний уровень загрязнения приводит к возникновению сукцессионных изменений, которые выражаются в перераспределении степени доминирования микробных видов. Этот уровень загрязнения сопровождается устойчивыми нарушениями нормального функционирования микробиоты.

3. Высокий уровень загрязнения характеризуется нарастанием сукцессионных изменений в микробной системе, полной сменой состава микроорганизмов. Доминирующее положение занимают микроорганизмы, резистентные к данному загрязняющему веществу.

4. Очень высокому уровню загрязнения соответствует практически полное подавление активности микроорганизмов.

Подземные воды являются уникальными биоценозами. При их исследовании удается обнаружить новые виды бактерий, причем как анаэробных, так и аэробных [6]. Микробиоценозы подземных вод участвуют в обеспечении экологических сервисов.

Они участвуют в круговороте химических элементов, извлекая их из одного вида органической форма и вовлекая в другую форму, тем самым обеспечивая чистоту подземных вод. В ряде случаев чистые подземные воды могут использоваться напрямую в качестве питьевой воды без дополнительной очистки, что также становится возможным благодаря деятельности бактериального компонента микробиоценоза подземных вод [7]. Выход подземных вод на поверхность в виде родников дает возможность изучать их биоценоз без дополнительных экономических затрат на обеспечение доступа к подземным пластам.

Загрязнение окружающей среды нефтяными углеводородами, как известно, может происходить при добыче нефти и ее транспортировке. При этом нефть и нефтепродукты попадают в почву и воду не только в аварийных ситуациях, и не только в результате разливов по поверхности. Известно, что в карстовых районах возможна миграция нефти при ее добыче внутри горных слоев. При этом на поверхности почвы уровень загрязнения нефтяными углеводородами не будет превышать установленных норм ПДК. В связи с этим представляет актуальность мониторинг состояния подземных вод в районах нефтедобычи, расположенных в районах карстовых массивов.

Цель настоящего исследования – изучить состав основных эколого-трофических групп аэробных бактерий в водах родника Арапов ключ, расположенного на территории потенциального нефтяного загрязнения.

#### **Материалы и методы исследования**

Период отбора образцов воды

Отбор образцов воды родника Арапов ключ производили в весеннее половодье и летнюю межень в 2016–2017 гг.

#### *Характеристика района отбора образцов*

Родник Арапов ключ располагается в Ординском районе Пермского края. Область питания водотоков в районе родника Арапов ключ располагается в пределах карстовых массивов на территории горного отвода месторождения нефти. Месторождение открыто в 1961 г. и активно разрабатывается с 1965 г. Степень выработки запасов нефти составляет 44 %.

#### *Количественный учет аэробных бактерий*

Определение количества клеток производили высевом на плотные питательные среды. В основе метода лежит принцип Коха, согласно которому каждая колония является потомством одной клетки. Разведение образцов воды готовят в стерильной

минеральной среде K1, с коэффициентом разведения 10. Стерильную среду разливают по 9 мл в стерильные пробирки. Затем в первую пробирку вносят 1 мл исследуемого образца воды. Полученное разведение тщательно перемешивают и далее последовательно переносят по 1 мл. Всего готовили 10 разведений.

Суспензию (0,1 мл) высевали поверхностным способом на агаризованную среду, соответствующую исследуемой экологотрофической группе. Высев производили из всех разведений в трехкратной повторности. После посева чашки помещали в термостат при +22°C.

Подсчет колоний производили через 14 суток инкубации, не открывая чашки Петри. Количество клеток в 1 мл исследуемого образца воды вычисляли по формуле

$$M = a \times 10^n / V,$$

где M – количество клеток в 1 мл, а среднее число колоний, выросших после посева из данного разведения, V – объем суспензии, взятый для посева, мл,  $10^n$  – коэффициент разведения.

*Среды, для учета отдельных эколого-трофических групп микроорганизмов*

Для выделения и роста нефтеокисляющих бактерий использовали минеральную среду K1 следующего состава (г/л):  $K_2HPO_4 \times 3H_2O$  – 4,0;  $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$  – 0,4;  $(NH_4)_2SO_4$  – 0,5;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,15;  $Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$  – 0,01;  $NaMoO_4 \times 2H_2O$  – 0,18;  $FeSO_4 \times 7H_2O$  – 1,98, дополненную 1 мл/л раствора микроэлементов, содержащего (г/л): ЭДТА – 2,50;  $ZnSO_4 \times 2H_2O$  – 10,95;  $FeSO_4 \times 7H_2O$  – 5,0;  $MnSO_4 \times 2H_2O$  – 1,54;  $CuSO_4 \times 5H_2O$  – 0,39;  $Co(NO_3)_2 \times 6H_2O$  – 0,24;  $Na_2B_4O_7 \times 10H_2O$  – 0,17; pH среды 7,3 [8]. Для получения агаризованной среды добавляли агар до конечной концентрации 1,5%. В качестве ростового субстрата добавляли каплю нефти на крышку перевернутой чашки Петри.

Для выделения и роста гетеротрофных бактерий использовали агаризованную среду LB (Лурия-Бертани), содержащую (г/л): триптон – 10, дрожжевой экстракт – 5, NaCl – 10, агар – 15 [9].

Для выделения и роста галофильных микроорганизмов использовали агаризованную среду Раймонда, содержащую (г/л):  $NH_4NO_3$  – 2;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,2;  $KH_2PO_4$  – 2;  $Na_2HPO_4$  – 3;  $Na_2CO_3$  – 0,1;  $CaCl_2 \times 6H_2O$  – 0,01; NaCl – 100 [10].

#### *Индекс нефтедеструкторов*

Расчет индекса нефтедеструкторов производили как отношение количества

колониеобразующих единиц бактерий-нефтедеструкторов в 1 мл образца воды к количеству колониеобразующих единиц гетеротрофных бактерий в 1 мл образца воды.

#### *Статистическая обработка результатов*

Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Полученные данные обрабатывали с использованием пакетов компьютерных программ Microsoft Excel 2013 и StatSoft STATISTICA 6.0. Все результаты представлены в виде средних значений с указанием доверительного интервала. Достоверность полученных результатов оценивалась с учетом критерия Стьюдента ( $p < 0,05$ ). Графический материал выполнен в программе Microsoft Excel 2013.

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

В биологическом мониторинге самостоятельный интерес представляет анализ состояния микробного и, в частности, бактериального, ценоза, обитающих в различных биотопах. В настоящем исследовании в качестве объекта выбраны подземные воды, выходящие на поверхность в виде родника под названием Арапов ключ.

Наличие нефтедобычи и карстовых пород в районе расположения исследуемого родника позволило рассматривать его как возможный модельный объект для изучения основных мониторинговых эколого-трофических групп бактериоценоза.

В процессе исследования учитывали три эколого-трофические группы микроорганизмов: гетеротрофы, галофилы и нефтедеструкторы.

Выбор групп обусловлен следующими причинами:

1. Наличие гетеротрофных микроорганизмов свидетельствует о поступлении в воду органического вещества.

2. Галофильные микроорганизмы характерны для засоленных вод. Изменение солености воды может происходить вследствие попадания рассолов с нефтью.

3. Нефтедеструкторы (нефтеокисляющие микроорганизмы) – указывают на стабильное присутствие в воде углеводов нефти.

Установлено, что в 2016 г. в водах родника Арапов ключ представлены две из исследуемых эколого-трофических групп: гетеротрофные микроорганизмы и нефтеокисляющие микроорганизмы (рис. 1).

Из рисунка видно, что гетеротрофные микроорганизмы по численности значительно превышают нефтеокисляющие бактерии.

В обеих эколого-трофических группах отмечена тенденция к увеличению численности в течение вегетативного сезона.

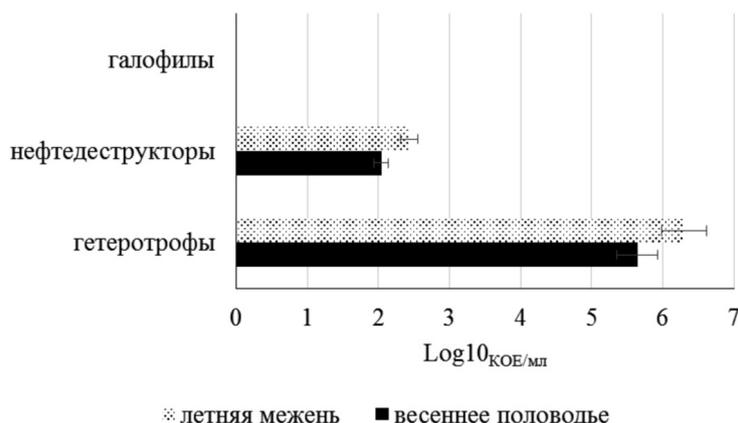


Рис. 1. Соотношение основных эколого-трофических групп в водах родника Арапов ключ в 2016 г.

Индекс нефтедеструкторов в весеннее половодье составил  $2,5 \times 10^{-4}$ , а в летнюю межень –  $1,4 \times 10^{-4}$ . Данное значение индекса свидетельствует о незначительной доле нефтеокисляющих бактерий в составе микробоценоза подземных вод родника Арапов ключ. При этом прослеживается тенденция к снижению доли нефтеокисляющих микроорганизмов в составе бактериоценоза в течение весенне-летнего периода. Данное явление может быть обусловлено двумя факторами: поступление легкодоступной органики в воды родника в летний период увеличивается, либо концентрация нефтяных углеводородов за тот же отрезок времени снижается, что делает затруднительным развитие группы нефтеокисляющих бактерий.

Однако, полученные результаты свидетельствуют о том, что нефтяные углеводороды проникают в воды исследуемого родника в незначительном количестве, но на протяжении всего исследованного периода 2016 г.

Галофильные микроорганизмы выявлены не были, что косвенно также подтверждает невысокий уровень загрязнения вод родника Арапов ключ нефтью и сопутствующими ее добыче веществами.

Анализ вод родника Арапов ключ, отобранных в летний период 2017 г., показал, что соотношение основных эколого-трофических групп микроорганизмов отличается от предыдущего года исследования.

Установлено, что в образцах воды 2017 г. присутствуют не только гетеротрофные и нефтеокисляющие микроорганизмы, но и галофильные (рис. 2).

Данные изменения в составе микробоценоза могут свидетельствовать о повы-

шении отрицательной нагрузки, вызванной не только непосредственно углеводородами нефти, но и сопровождающими их солеными пластовыми водами.

Анализ динамики численности каждой из эколого-трофических групп микроорганизмов в течение сезона выявил закономерность аналогичную предыдущему году исследования, а именно – увеличение численности каждой группы за время вегетативного периода.

Индекс нефтедеструкторов превышал показатели 2016 г. на два порядка и составлял в весеннее половодье –  $3,9 \times 10^{-2}$ , а в летнюю межень –  $1,1 \times 10^{-2}$ . При этом так же отмечено снижение показателя индекса нефтедеструкторов в течение исследованного сезона.

Анализ средних показателей численности эколого-трофических групп в 2016 и 2017 гг. показал разнонаправленную динамику (рис. 3).

Численность гетеротрофных микроорганизмов была достоверно выше в 2016 г., тогда как численность нефтедеструкторов в 2017 г. более чем на порядок превышала аналогичный показатель 2016 г. Галофильная группа, как уже было сказано выше, отмечена только в водах 2017 г.

Помимо численности эколого-трофических групп был проведен учет морфотипов бактерий, выявленных в каждой из исследованных групп. Анализ динамики количества морфотипов в каждой эколого-трофической группе в течение двух лет показал, что увеличение морфологического разнообразия имеет прямую линейную зависимость с увеличением общей численности внутри каждой группы. При этом коэффициент корреляции составляет 0,96–0,98.

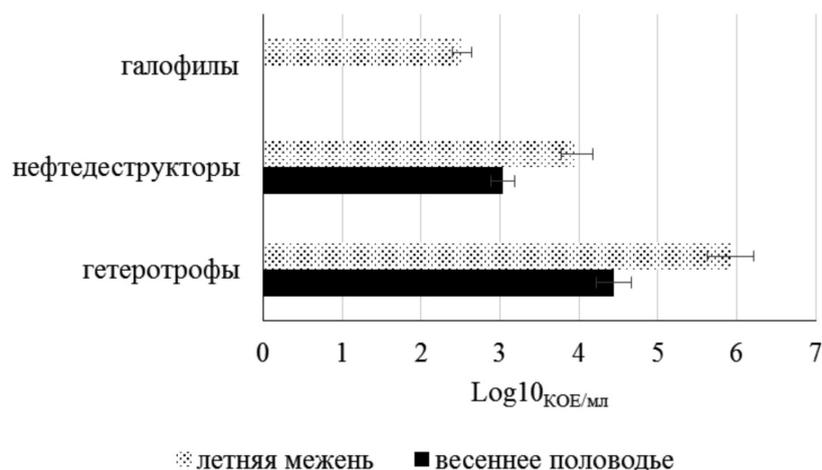


Рис. 2. Соотношение основных эколого-трофических групп в водах родника Арапов ключ в 2017 г.

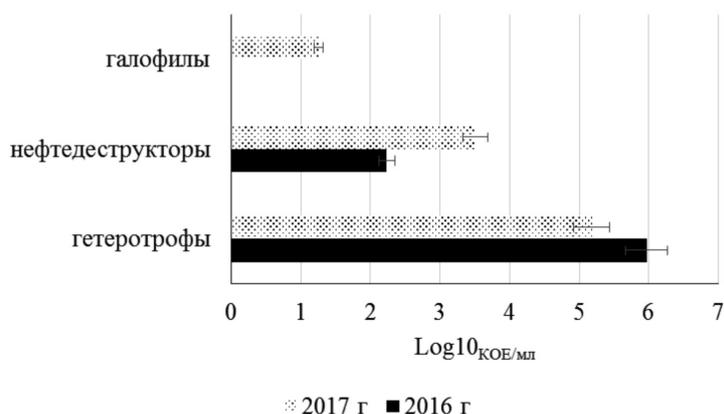


Рис. 3. Соотношение эколого-трофических групп бактерий в бактериоценозе вод родника Арапов ключ в период 2016–2017 гг.

С позиций мониторинговых исследований выявленная динамика в численности учитываемых эколого-трофических групп свидетельствует о повышении негативной нагрузки на биоценоз подземных вод родника Арапов ключ вследствие увеличения поступления нефтяных углеводородов. За время исследуемого периода никаких аварийных ситуаций, связанных с разливами нефти, в данном районе отмечено не было. Таким образом, поступление соленых вод и нефти в подземные воды происходит в результате перемещения по карстовым слоям без выхода на поверхность.

Проведенные исследования выявили флуктуационные изменения микробной системы, затрагивающие интенсивность микробиологических процессов, а не сукцессионные изменения. Полученные дан-

ные свидетельствуют о невысоком уровне загрязнения исследуемых подземных вод.

#### Заключение

В результате проведенных мониторинговых исследований бактериоценоза подземных вод, выходящих на поверхность в виде родника Арапов ключ, установлено соотношение основных эколого-трофических групп аэробных бактерий в течение двух вегетативных сезонов (2016–2017 гг.). Выявлено присутствие нефтедеструкторов и галофилов, что свидетельствует о поступлении в исследуемые воды нефтяных углеводородов и соленых вод. Так как на поверхности разливов нефти в исследуемом периоде не отмечено, можно предположить, что поступление поллютантов происходит по карстовым породам и носит с точки зре-

ния экологического мониторинга скрытый характер. Таким образом, биоценоз подземных вод испытывает отрицательное влияние вследствие загрязнения нефтью и сопутствующими соединениями, однако уровень влияния не критический и позволяет компонентам биоценоза находиться во флуктуационных изменениях, поддерживая равновесие ценоза в целом.

#### Список литературы

1. El-Sheshtawy H.S., Khalil N.M., Ahmed W., Abdallah R.I. Monitoring of oil pollution at Gemsa Bay and bioremediation capacity of bacterial isolates with biosurfactants and nanoparticles. *Marine Pollution Bulletin*. 2014. V. 87. P. 191–200.
2. Бузмаков С.А. Антропогенная трансформация природной среды // Географический вестник. 2012. № 4 (23). С. 46–50.
3. Costeira R., Doherty R., Allen C.C.R., Larkin M.J., Kulakov L.A. Analysis of viral and bacterial communities in groundwater associated with contaminated land. *Science of the Total Environment*. 2019. V. 656. P. 1413–1426.
4. Andreoni V., Gianfreda L. Bioremediation and monitoring of aromatic polluted habitats. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 76. P. 287–308.
5. Jernelöv A. Environmental Effects of Terrestrial Oil Spills. *Encyclopedia of the Anthropocene*. 2018. V. 1. P. 323 – 335.
6. Gibert J.U., Culver D.C. Assessing and conserving groundwater biodiversity: an introduction. *Freshwater Biology*. 2009. V. 54. P. 639–648.
7. Jacobsen C.S., Hjelmsø M.H. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. *Current Opin. Biotechnol.* 2014. V. 27. P. 15–20.
8. Егорова Д.О., Демаков В.А., Плотникова Е.Г. Разложение смеси (три-гекса)хлорированных бифенилов штаммами рода *Rhodococcus* // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 6. С. 655–662.
9. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1951. V. 62. P. 293–300.
10. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons. *Develop. Ind. Microbiol.* 1961. V. 2. № 1. P. 23–32.