

УДК [593.17+595.18]:[504.5:665.753.4]

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОРГАНИЗМОВ-ГЕТЕРОТРОФОВ СЕННОГО НАСТОЯ ДЛЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ НЕФТЕПРОДУКТОВ

Пахомова Н.А., Минченко Е.Е.

ФГБОУ ВПО «Мурманский государственный технический университет»,
Мурманск, e-mail: minchenok.elena@yandex.ru

Проведен анализ специфических реакций организмов-гетеротрофов сеного настоя на действие водных растворов нефтепродуктов. Выявлено, что раствор дизельного топлива в заданных концентрациях первоначально ингибирует, а затем стимулирует развитие инфузорий и коловраток. Показано, что причиной вспышки численности инфузорий в первые сутки являются нефтеокисляющие бактерии. В начале опыта нефтяные углеводороды переходят в воду в больших количествах, а затем скорость перехода снижается. Уменьшение содержания питательных веществ на поздних сроках опыта вызывает инцистирование инфузорий. Оставшаяся нефтяная пленка одновременно является субстратом и источником пищи для коловраток. По мере уменьшения площади пленки часть коловраток переходит в стадию покоя, или анабиоза. Процесс самоочищения от дизельного топлива достаточно длительный, и в его окислении принимают участие различные виды живых организмов: на начальном этапе – нефтеокисляющие бактерии, жгутиконосцы и инфузории, на конечном этапе – коловратки.

Ключевые слова: сеной настой, организмы-гетеротрофы, биотестирование, инфузории, коловратки, дизельное топливо

POSSIBILITIES OF USING OF HETEROTROPHIC ORGANISMS OF HAY INFUSION FOR BIOTESTING OF OIL PRODUCTS

Pakhomova N.A., Minchenok E.E.

Murmansk State Technical University, Murmansk, e-mail: minchenok.elena@yandex.ru

The analysis of the effect of specific reactions of heterotrophic organisms from hay infusion on water solution of oil-product was done. It was revealed that the solution of diesel fuel in the given concentrations initially inhibited and then stimulated the development of ciliates and rotifers. It was shown that the cause of ciliates outbreaks during the first day were the oil-oxidizing bacteria. At the beginning of the experiment oil hydrocarbons migrated into the water in large numbers, and then the transition rate was reduced. The reduction of nutrient content at the later stages of the experiment caused encystment of infusoria. The remaining oil film acted both as a substrate and as food source for rotifers. With decreasing of oil film area the part of rotifer underwent a resting phase or anabiosis. The process of self-purification from the diesel fuel takes long time, and various species of living organisms are involved in its oxidation: at the initial stage – oxidizing bacteria, flagellates and ciliates; at the final stage – rotifers.

Keywords: hay infusion, heterotrophic organisms, biotesting, ciliates, rotifers, diesel fuel

Одним из важных направлений прикладной биотехнологии является разработка эффективных биологических методов оценки состояния природной среды, загрязнение которой токсичными веществами в настоящее время приобрело комплексный характер. Для оценки токсичности природных вод, промышленных сбросов, почвы, кормов и прочих объектов окружающей среды, а также новых химических веществ и внутренних сред организма человека и животных используют тесты на различных живых организмах [2, 7].

Биотестирование на клеточно-организменном уровне начало широко применяться с конца 80-х годов XX века. На сегодняшний день успешно используются методы биотестирования, проводимые на естественных и модельных сообществах [1].

Общеизвестно, что свободно живущие инфузории очень быстро реагируют на изменение среды обитания и могут быть использованы в качестве индикаторов. При этом установлено, что одни виды при перенесении их в загрязненную среду погибают

в течение первых минут или часов опыта, а для других видов эта же среда становится стимулирующей и вызывает интенсивное размножение. Биотестирование на инфузориях с большей степенью достоверности позволяет определить степень интегральной токсичности всех экотоксикантов, содержащихся в объекте исследования [2, 6].

Цель исследования – изучить специфические реакции организмов-гетеротрофов сеного настоя в ответ на загрязнение среды нефтепродуктами.

Материал и методы исследования

В качестве тест-объекта была использована 10-суточная культура сеного настоя, содержащая инфузории *Paramecium caudatum*, *Colpoda aspera* и коловратки семейств Philodinidae и Dicranophoridae. Дизельное топливо (ДТ) разводилось в дистиллированной воде в концентрациях 0,1; 1,0л и 10,0 мг/л. В чашках Петри в равных пропорциях смешивали 10-суточную культуру и водный раствор дизельного топлива разных концентраций. Объем пробы составил 4 мл. Контролем в эксперименте был сеной настой. Биотестирование проводили в течение 6 суток. Просмотр проб проводили через 15 мин, 1 ч, 24 ч,

2 сут, 4 сут, 6 сут при увеличении: об.10х, ок.10х. Подсчет инфузорий производили в 10 полях зрения. Пробы фотографировали при увеличении 1х, 1,5х, 2х, 3х. В течение месяца проводилось описание поведенческих реакций инфузорий и коловраток.

Результаты исследования и их обсуждение

На кафедре биоэкологии биологического факультета Мурманского государственного технического университета работы по изучению динамики микрокосма сеного настоя проводятся с 2010 года [4, 5]. Первым этапом этого исследования было эмпирическое накопление данных по каче-

ственному составу организмов, последовательно сменяющих друг друга. В результате установлено, что в каждой последующей серии опытов видовой состав населения сеного настоя отличался от предыдущей серии, однако порядок сукцессионного ряда соблюдался. Речь идет о свободноживущих инфузориях родов *Colpoda*, *Paramecium*, *Oxytricha*, *Stylonichia*, *Vorticella*. Все перечисленные инфузории могут присутствовать в сеном настое одновременно, однако продолжительные наблюдения показывают определенную закономерность сменяемости видов (рис. 1).

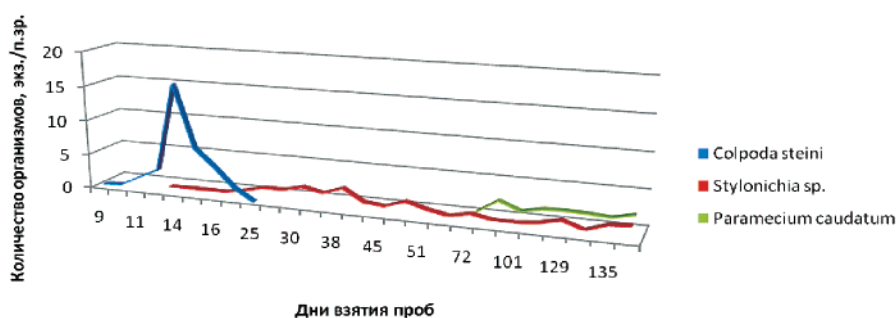


Рис. 1. Динамика численности инфузорий в сеном настое

Проводя регулярные подкормки молоком, в микрокосме можно создать условия, оптимальные для поддержания стабильной численности популяций инфузорий *Paramecium caudatum*, *Oxytricha sp.*, *Stylonichia sp.* Коловратки в культуре, как правило, появляются по мере созревания сеного настоя.

В опыте по биотестированию водного раствора ДТ использована культура, выращенная на сеном отваре с добавлением воды из аквариума. Ответная реакция сообщества гетеротрофов была обусловлена индивидуальными свойствами таксонов к условиям среды.

Через 15 минут после смешивания культуры сеного настоя с растворами ДТ разных концентраций обнаружено, что парамеции резко снизили скорость движения. Они формируют группы численностью 10–20 экз./п.зр., преимущественно в детрите. Кольподы проявляют повышенную активность, выражающуюся в увеличении скорости движения по сравнению с контролем.

Контроль дает следующую картину: парамеции – 3 экз./п.зр., кольподы – 15–20 экз./п.зр., нормальной двигательной активности.

Спустя 1 час в растворах с ДТ обнаружены следующие изменения: парамеции активно движутся, скоплений практически

не образуют, встречаются единичные неподвижные особи. Количество неподвижных (малоподвижных) инфузорий растет с увеличением концентрации нефтепродукта. В эти сроки опыта инфузории *Colpoda aspera* наиболее активно формируют группы численностью более 40 экз./п.зр. Отмечено появление мелких цист.

Через 1 сутки после начала опыта в контрольном растворе количество парамеций достигает 4–5 экз./п.зр., количество кольпод в среднем составляет 18 экз./п.зр. Большинство организмов в активном состоянии.

В водных растворах ДТ разной концентрации наблюдается экспоненциальный рост *Colpoda aspera*. Вспышка численности кольпод отмечена во всех пробах с ДТ. Численность организмов составила более 150 экз./п.зр. (рис. 2а). Они отличаются повышенной двигательной активностью. Цитоплазма инфузорий вакуолизирована. Число пищеварительных вакуолей у кольпод возрастает до 4–5 шт. Численность парамеций в растворах с ДТ также существенно возросла и составила 15–40 экз./п.зр. Отмечено увеличение количества пищеварительных вакуолей у парамеций. Размеры инфузорий увеличены в 1,5–2 раза по сравнению с контрольными экземплярами (рис. 2б). В детрите парамеции образуют группы численностью выше 50 экз./п.зр.

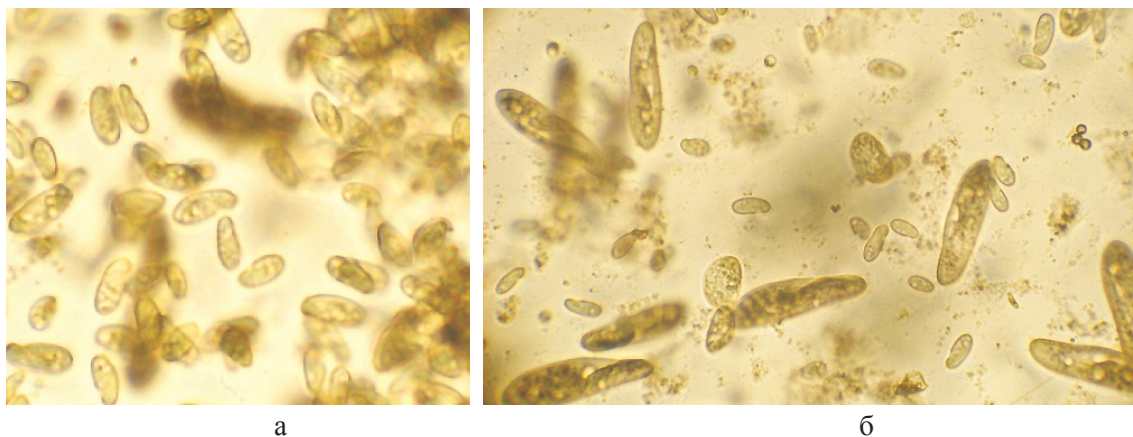


Рис. 2. Проба $C_{om} = 10,0$ мг/л спустя 1 сутки:
 а – экспоненциальный рост *Colpoda aspera*; б – увеличение размеров *Paramecium caudatum*;
 ув. микроскопа об. 10х, ок. 10х; ув. фотоаппарата 1,5х, 3х

подавляющая часть инфузорий активна, однако можно отметить некоторое снижение двигательной активности. С ростом концентрации водного раствора ДТ двигательная активность парамеций снижается. Многие инфузории активно делятся. Факт скачкообразного увеличения численности инфузорий можно объяснить тем, что в водных растворах ДТ при $t = 20^\circ\text{C}$ активно развиваются нефтеокисляющие бактерии, которые являются источником пищи для инфузорий-бактериофагов. Потребление нефтесодержащей органики происходит по схеме: ДТ – нефтеокисляющие бактерии – инфузории (кольподы, парамеции).

Тест-объект *P. caudatum* обладает высокой чувствительностью, но одновременно и высокой устойчивостью по отношению к загрязнению воды. Популяция *P. caudatum* способна адаптироваться к загрязнению воды дизельным топливом. Фактор питания на ранних этапах взаимодействия с загрязняющим веществом преобладает над токсичностью [3].

Спустя 2 суток в контроле существенных изменений, касающихся численности парамеций и кольпод, не обнаружено. Отмечено появление инфузорий *Colpoda sicullus* и единичных одноклеточных водорослей.

В растворах ДТ разных концентраций выявлены такие изменения: во всех пробах численность парамеций уменьшилась в 1,5–2 раза, численность кольпод катастрофически снизилась практически до начального уровня. Большинство парамеций медленно двигается, количество пищеварительных вакуолей достигает 4–6 шт. На этом сроке опыта подавляющая часть кольпод неподвижна.

Через 4 суток контрольный сенной раствор был представлен парамециями численностью до 2–3 экз./п.зр. Инфузории *S. aspera* практически полностью цистировались.

В водных растворах ДТ численность *S. aspera* резко упала и составила от 3 до

12 экз./п.зр. Во всех пробах отмечается появление инфузории *S. sicullus*. Численность парамеций существенно не изменилась и колебалась в пределах 10–30 экз./п.зр. Количество пищеварительных вакуолей у парамеций уменьшилось.

Через 6 суток состав и численность инфузорий в контрольном растворе не претерпел существенных изменений. Во всех испытуемых растворах ДТ отмечается снижение численности парамеций, уменьшение их размеров. Сокращение пищеварительных вакуолей отмечается во всех пробах, кроме пробы с $C_{om} = 10,0$ мг/л. Численность парамеций колебалась в пределах 8–25 экз./п.зр. Численность *S. aspera* представлена единичными экземплярами. В результате конкуренции (выедания) их заменили более крупные кольподы. Движение инфузорий замедлено, часть организмов находится в неподвижном состоянии.

Динамика численности инфузорий *Paramecium caudatum* и *Colpoda aspera* в течение опыта представлена на рис. 3а, б.

Таким образом, проведенный эксперимент показал, что раствор ДТ заданных концентраций оказывает стимулирующее действие на инфузорий *P. caudatum* и *S. aspera* в первые сутки. Фактор питания на ранних этапах взаимодействия с растворами ДТ преобладает над токсичностью.

В последующие сроки опыта наблюдается снижение численности парамеций в 1,5–2 раза. В поздние сроки опыта численность парамеций колебалась в диапазоне 8–25 экз./п.зр, что свидетельствует об адаптивных возможностях популяции *P. caudatum* к действию ДТ. Численность кольпод в течение опыта изменялась скачкообразно. На поздних сроках опыта их численность снизилась, они единично встречались в поле зрения микроскопа.

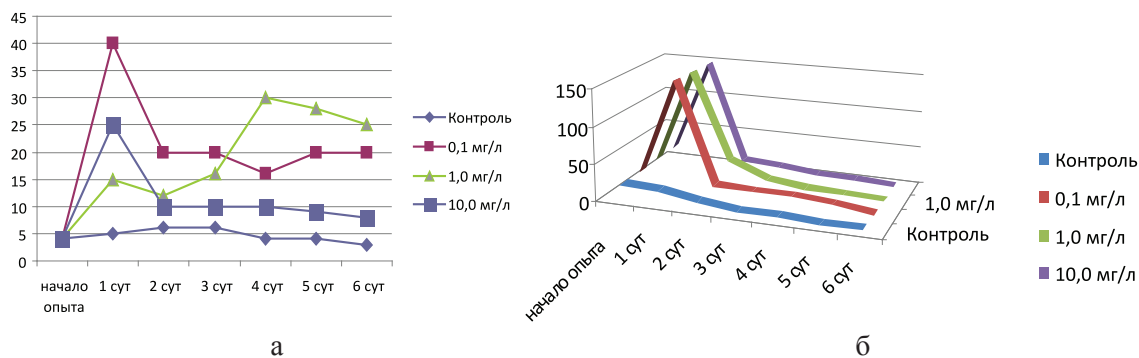


Рис. 3. Динамика численности *Paramecium caudatum* (а) и *Colpoda aspera* (б) в течение опыта

В течение всего времени наблюдения в пробах отмечено присутствие коловраток, относящихся к двум семействам *Philodinidae* и *Dicranophoridae*. Экспоненциальное увели-

чение их численности совпадает с уменьшением количества инфузорий. На рис. 4 а, б, в представлен рост численности коловратки *Philodina* sp. в течение месяца.

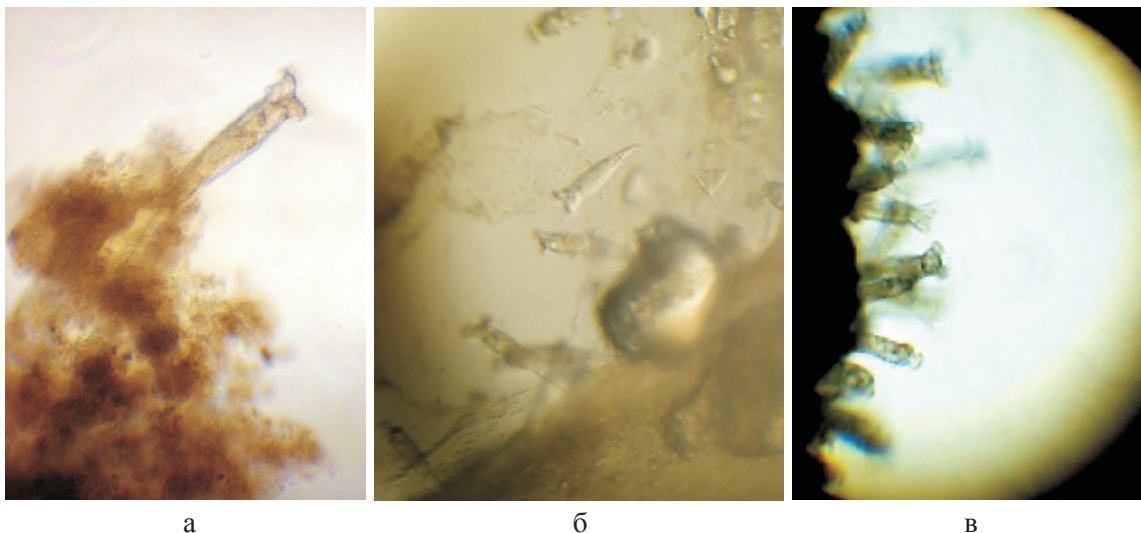


Рис. 4. Рост численности *Philodina* sp. в опыте; ув. микроскопа об. 10х, ок. 10х. Ув. фотоаппарата 1х, 2х

Спустя 1 месяц ДТ образовало на поверхности раствора пленку, которая и послужила субстратом для массового развития коловраток и, по-видимому, источников

питательных веществ. По мере уменьшения площади пленки было отмечен переход коловраток в состояние анабиоза, или высыхания (рис. 5).

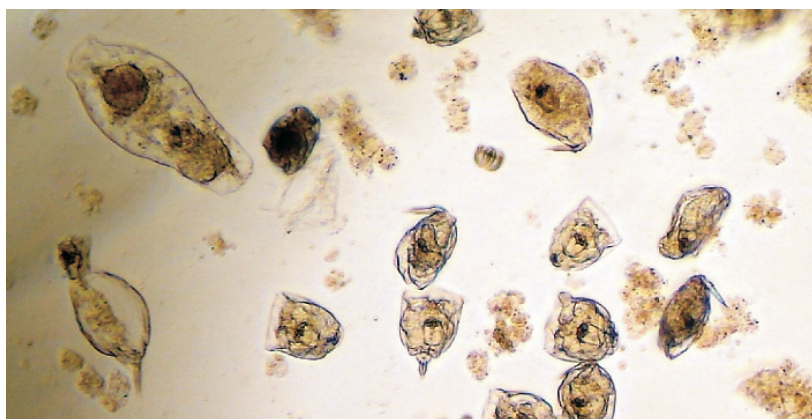


Рис. 5. Коловратки в состоянии анабиоза; ув. микроскопа об.10х, ок.10х.; ув. фотоаппарата 3х

Заключение

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод, что раствор, содержащий ДТ в концентрациях, даже значительно превышающих ПДК, уже в первые сутки стимулирует размножение инфузорий. Причиной вспышки численности являются нефтеокисляющие бактерии, однако через двое суток численность инфузорий при всех концентрациях ДТ снижается, но остается во всех сериях опыта выше, чем в контроле. Следовательно, можно говорить о стимулирующей роли ДТ, содержащего органические вещества. В первые дни нефтяные углеводороды переходят в воду в больших количествах, а затем скорость перехода снижается, и уменьшение содержания питательных веществ вызывает инцистирование инфузорий [3]. Оставшаяся нефтяная пленка одновременно является субстратом и источником пищи для коловраток. По мере уменьшения площади органической пленки часть коловраток переходит в стадию покоя, или анабиоза.

Растворы ДТ первоначально ингибируют, а затем стимулируют развитие инфузорий и коловраток. Процесс самоочистки от ДТ достаточно длительный, и в его окислении принимают участие различные виды живых организмов: на начальном этапе – нефтеокисляющие бактерии, жгутиконосцы и инфузории, на конечном этапе – коловратки.

Своеобразие сменяющихся сообществ в определенной степени определяется нагрузкой по органическим загрязняющим веществам и эффективностью их разложения.

Полученные результаты будут использованы для разработки и апробации методики биотестирования загрязняющих веществ в рамках открытой на кафедре биоэкологии ГБ НИР «Разработка методов биоиндикации и биотестирования загрязнения пресноводных водоемов и их применение в условиях Кольского полуострова» (№ ГР 01201002677).

Список литературы

- Алекперов И.Х. Успехи и перспективы использования свободноживущих инфузорий в биотестировании различных токсикантов в Азербайджане // IX съезд Гидробиологического общества РАН, 18-22 сент. 2006 г.: тезисы докл. / Ин-т экологии Волжского бассейна РАН. – Тольятти, 2006. – Т. 1. – С. 5.
- Виноходов Д.О. Научные основы биотестирования с использованием инфузорий: автореферат дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.23. – СПб., 2007. – 40 с.
- Гордеева Ф.В. Оценка токсичности воды и донных отложений водоёмов и почв территории Тюменской области с использованием инфузории *Paramecium caudatum*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08. – Борок, 2010. – 23 с.
- Пахомова Н.А., Минченко Е.Е. Модель гетеротрофной сукцессии в культуре сеного настоя // Наука и образование – 2010 [Электронный ресурс]: юбилейная междунар. науч.-техн. конф., посвящ. 60-летию МГТУ, Мурманск, 5-9 апр. 2010 г. / Федер. агентство по рыболовству, Мурман. гос. техн. ун-т [и др.]. – Мурманск, 2010. – С. 834–836. – URL: <http://www.mstu.edu.ru/> (дата обращения: 22.12.2011).
- Пахомова Н.А., Минченко Е.Е. Фоновые индикаторные виды микроорганизмов сеного настоя // Наука и образование – 2011 [Электронный ресурс]: междунар. науч.-техн. конф., Мурманск, 4-8 апр. 2011 г. / Федер. агентство по рыболовству, Мурман. гос. техн. ун-т [и др.]. – Мурманск, 2011. – С. 642–647. – URL: <http://www.mstu.edu.ru/> (дата обращения: 20.01.2012).
- Попова Л.А. Развитие инфузорий на различных субстратах в условиях нефтяного загрязнения // Экология моря. – 2007. – Вып. 73. – С. 79–84.
- Трояновская Е.С., Абросимова О.В., Тихомирова Е.И. Оценка состояния почв городских территорий методом комплексного биотестирования // Теоретическая и прикладная экология. – 2011. – № 2. – С. 32–36.

References

- Alekperov I.H. *Uspehi i perspektivy ispol'zovanija svobodnozhivuvih infuzorij v biotestirovanii razlichnyh toksikantov v Azerbajdzhane* // IX s#ezd Hidrobiologicheskogo obwestva RAN, 18-22 sent. 2006 g.: tezisy dokl. / In-t ekologijii Volzhskogo bassejna RAN. Tol'jatti, 2006..T. 1. pp. 5.
- Vinohodov D.O. *Nauchnye osnovy biotestirovanija s ispol'zovaniem infuzorij*: avtoreferat dis. ... d-ra biolog. nauk : 03.00.23. Sankt-Peterburg, 2007. 40 p.
- Gordeeva F.V. *Ocenka toksichnosti vody i donnyh otlozhenij vodojomov i pochv territorii Tjumenskoj oblasti s ispol'zovaniem infuzorii Paramecium caudatum* : avtoref. dis. ... kand. biolog. nauk : 03.02.08. Borok, 2010. 23 p.
- Pahomova N.A., Minchenok E.E. *Model' geterotrofnof sukcessii v kul'ture sennogo nastoja – Nauka i obrazovanie – 2010* [Jelektronnyj resurs] : jubilejnaja mezhdunar. nauch.-tehn. konf., posvjaw. 60-letiju MGTU, Murmansk, 5-9 apr. 2010 g. / Feder. agentstvo po rybolovstvu, Murman. gos. tehn. un-t [i dr.]. Murmansk, 2010. pp. 834–836. – URL: <http://www.mstu.edu.ru/> (data obrawenija: 22.12.2011).
- Pahomova N. A., Minchenok E. E. *Fonovyje indikatorynye vidy mikroorganizmov sennogo nastoja – Nauka i obrazovanie – 2011* [Jelektronnyj resurs] : mezhdunar. nauch.-tehn. konf., Murmansk, 4-8 apr. 2011 g. / Feder. agentstvo po rybolovstvu, Murman. gos. tehn. un-t [i dr.]. – Murmansk, 2011. – S. 642–647. URL: <http://www.mstu.edu.ru/> (data obrawenija: 20.01.2012).
- Popova L.A. *Razvitie infuzorij na razlichnyh substratah v uslovijah nefljanogo zagrjaznenija – Jekologija morja*. 2007. Vol. 73. pp. 79–84.
- Trojanovskaja E.S., Abrosimova O.V., Tihomirova E.I. *Ocenka sostojanija pochv gorodskih territorij metodom kompleksnogo biotestirovanija – Teoreticheskaja i prikladnaja jekologija*. 2011. no. 2. pp. 32–36.

Рецензенты:

Зензоров В.С., д.б.н., ведущий научный сотрудник, Мурманский морской биологический институт КНЦ РАН, г Мурманск;
Шошина Е.В., д.б.н., профессор кафедры биологии, ФГБОУ ВПО «Мурманский государственный технический университет», г. Мурманск.

Работа поступила в редакцию 19.03.2012.