

УДК 579.266:574

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИЗНАКОВ ДЕГРАДАЦИИ УГЛЕВОДОРОДОВ
СРЕДИ ГЕТЕРОТРОФНОЙ МИКРОФЛОРЫ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ
ПОЧВЫ И НЕФТЕШЛАМОВ**

Мельников Д.А. – аспирант

Карасева Э.В. – к. б. н., профессор

Кубанский государственный университет

В работе изучалась способность к росту гетеротрофных бактерий на n-алканах и ароматических углеводородах. Установили, что разнообразие спектров потребляемых углеводородов (коэффициент Евклидова разнообразия) у микрофлоры почвы, не загрязненной нефтепродуктами, практически не отличается от микрофлоры грунта в процессе микробиологической очистки. Тот же показатель разнообразия спектров потребляемых углеводородов равняется нулю у микрофлоры нефтешламов до обработки.

Известно, что черноземные почвы отличаются высокой концентрацией микроорганизмов [1], нефтешламы также характеризуются присутствием в них гетеротрофных микроорганизмов [2]. Очевидно, что при исследовании процесса биodeградации нефтепродуктов в различных объектах необходимо изучение разнообразия трофических возможностей у гетеротрофной микрофлоры по отношению к индивидуальным углеводородам – компонентам поллютантов. Это поможет понять принципы функционирования углеводородокисляющих сообществ.

Целью данной работы стала оценка и сравнение разнообразия спектров потребляемых углеводородов у микроорганизмов, выделенных из нефтешламов, почвы и грунта на завершающем этапе биоремедиации. В

своём исследовании мы стремились выделить как можно больше изолятов гетеротрофных бактерий с учетом концентрации бактерий в высеве и исследовать спектр потребляемых углеводов у выделяемой микрофлоры. На основании полученных данных выделили минимальную группу углеводов, которая позволяет оценить углеводородокисляющую направленность штамма.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроорганизмы выделяли из чистой почвы (чернозема), нефтешлама на завершающей стадии детоксикации и двух образцов нефтешламов, не подвергавшихся очистке. Нефтешлам №1 представлял собой твердую черную массу, концентрация нефтепродуктов 345 г/кг, срок хранения более 40 лет, отобран из амбара накопителя. Нефтешлам №2 отобран из нефтеловушки, он содержал нефтяные отходы, полученные при зачистке резервуаров. Концентрация нефтепродуктов в данном образце составила 340 г/кг.

Нефтешлам на завершающем этапе очистки (в дальнейшем грунт) отобран с площадки биологической очистки нефтешлама, обрабатываемого по технологии центра "Биотехнология" КубГУ. К моменту отбора пробы он представлял собой грунт с остаточным содержанием углеводов – 34,8 г/кг. Принципы технологии детоксикации описаны в работе [3]. В очищаемый шлам в процессе биоремедиации вносили биогенные элементы, структурирующие вещества, регулировали водный режим.

Содержание нефтепродуктов в нефтешламах определяли флюориметрически на "Флюорат 02-3М" по стандартной методике согласно ПНДФ 16.1.21-98 КХА почв МВИ массовой доли нефтепродуктов в пробах почв на анализаторе жидкости "Флюорат 02".

Выделение и количественный учет микроорганизмов проводили методом кратных разведений почвы (нефтешлама, грунта), суспендированной

в физиологическом растворе. Четыре грамма почвы (нефтешлама, грунта) разводили в 40 мл физиологического раствора. Далее по стандартной методике производили десятикратные разведения, а начиная с четвертого разведения для нефтешламов (грунта) и с пятого для почвы – двукратные разведения. Соответственно посевы (0,1 мл почвенной суспензии) производили из последнего десятикратного разведения и двух первых двукратных разведений на стандартный питательный агар для гетеротрофных микроорганизмов. Такой способ разведений дал возможность выделить в чистой культуре оптимальное количество изолятов для дальнейших исследований.

Для оценки способности к росту на различных углеводородах производили посев чистых культур штрихом на плотную минеральную среду с углеводородами. Состав плотной минеральной среды: нитрат калия – 4,0 г, однозамещенный фосфат калия – 0,6 г, двузамещенный фосфат натрия (двенадцативодный) – 1,4 г, сульфат магния – 0,8 г, агар – 20 г, вода (водопр.) до 1 л. В качестве единственного источника углерода и энергии использовали индивидуальные n-алканы ряда гексан – октадекан, бензол (Benz) и его производные – 1,2,4-триметилбензол (псевдокумол – Psk), бутилбензол (b-Benz), o-ксилол (o-Xyl), толуол (Tol). Также производили посевы выделенной микрофлоры на минеральную среду с хлороформенным экстрактом соответствующего объекта (нефтешламы и грунт). Так как чистая почва не содержала нефтепродукты, микроорганизмы, выделенные из нее, культивировали на минеральной среде с сырой нефтью, взятой в качестве модельного поллютанта. Все субстраты вносили в расплавленную среду в концентрации 0,2 % (об). Чашки с легкими углеводородами (n-алканы ряда гексан – додекан, бензол и его производные) помещали в закрытый эксикатор, на дно которого наливали 10 мл углеводорода. Нафтид

нефтешлама вносили в плотную минеральную среду в бензольной эмульсии. Расплавленную среду нагревали и выдерживали в течение одного часа на кипящей водяной бане в вытяжном шкафу для удаления растворителя и периодически встряхивали. В результате получали дисперсию нефтепродукта в плотной минеральной среде. Культивировали при комнатной температуре в течение 7 суток. Учитывали результаты по системе "+" (наличие роста) и "-" (отсутствие роста).

Для группировки признаков деградации углеводов в зависимости от качественных особенностей спектра потребляемых углеводов использовали многомерное шкалирование, модуль (PROXSCAL, порядковая модель с разрешением связанных наблюдений) программы SPSS 11.5 for Windows. В качестве дистанции между объектами использовали Евклидову меру для бинарных данных.

Для измерения взаимосвязи между количеством деградируемых углеводов и способностью к росту на поллютанте использовали тест хи-квадрат и коэффициент неопределенности в качестве меры связи. Анализ провели в программе SPSS 11.5 for Windows.

Для измерения разнообразия выделенной микрофлоры с учетом степени сходства индивидуальных характеристик роста штаммов на различных углеводородах использовали коэффициент Евклидова разнообразия (EDC - Euclidean diversity coefficient) [4]. Формула коэффициента Евклидова разнообразия:

$$H(p) = \frac{1}{2} \sum_i \sum_j p_i p_j d_{ij}^2,$$

где p – доли i -того и j -того фенотипа, d_{ij} – дистанция между i -тым и j -тым фенотипом, измеряемая как

$$d_{ij} = \sqrt{1 - s_{ij}},$$

где s_{ij} – мера сходства между фенотипами. В данном исследовании использовали следующую меру сходства: отношение количества совпадающих признаков у пары штаммов к общему количеству признаков –

$$s_{ij} = \frac{a + d}{a + b + c + d},$$

где в стандартной нотации для бинарных данных a (1,1), b (1,0), c (0,1), d (0,0).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выделения чистых культур углеводородокисляющих микроорганизмов и оценки роли гетеротрофных микроорганизмов в процессах деградации углеводородов проводили исследование содержания микрофлоры данной группы в чистой почве, двух образцах нефтешлама и образца грунта на завершающем этапе биоремедиации, содержащего остаточный нафтид нефтешлама. Изоляты, выделенные из разных объектов, приведены в таблице 1. Для микрофлоры, выделенной из нефтешлама №1 и №2, было характерно отсутствие углеводородокисляющих микроорганизмов в исследуемом разведении. Микрофлора, выделенная из почвы и грунта, характеризовалась значительно большей долей изолятов, способных расти на углеводородах. Среди 85 изолятов, выделенных из грунта, было обнаружено 47 фенотипов, которые различались по спектру потребляемых углеводородов.

Таблица 1 – Распределение изолятов, выделенных из чернозема, и нефтешламов в зависимости от разведения и среды выделения

Объект	Разведение 1	Разведение 2	Разведение 3
Почва	35	23	11

Нефтешлам №1	20	0	0
Нефтешлам №2	19	0	0
Грунт	39	31	15

Примечание: для нефтешламов и грунта разведение 1 – в 10^5 раз, разведение 2 – в 2×10^5 раз, разведение 3 – в 4×10^5 раз, для почвы разведение 1, 2 и 3, соответственно, в 10^6 , 2×10^6 , 4×10^6 раз.

Из 69 изолятов, выделенных из почвы, было описано 35 фенотипов, отличающихся по спектру потребляемых углеводов. Среди микроорганизмов, выделенных из почвы, 17,4 % были способны утилизировать сырую нефть, а среди выделенных из грунта 38,8 % поддерживали рост на остаточном нафтиде данного грунта. Такое распределение можно объяснить тем, что почва не была загрязнена нефтью, а грунт содержал собственно тот нафтид, на котором испытывали рост выделяемых микроорганизмов. Тем не менее можно признать значительной долю нефтеокисляющих микроорганизмов, присутствующих в чистой почве.

Особенности распределения уникальных фенотипов (по признакам роста на углеводах) среди микроорганизмов, выделенных из разных разведений из почвы и грунта, показали некоторое несовпадение с моделью кратных разведений. В случае почвы из первого разведения (табл. 1) выделено 88,5 % изолятов, уникальных по фенотипу, из второго – 91,3 %, а все изоляты, выделенные из третьего разведения имели уникальные фенотипы. Под уникальным фенотипом подразумевали спектр потребляемых углеводов, не встретившийся более чем у одного штамма, выделенного со всех трех разведений. Для микрофлоры, выделенной из грунта, наблюдали аналогичную картину: из первого разведения выделено 84,6 % изолятов, уникальных по фенотипу, из второго – 67,7 %, из третьего разведения 80,0 %

изолятов имели уникальные фенотипы. Эти данные позволяют говорить об эффекте разведения, что, впрочем, согласуется с современными представлениями в области почвенной микробиологии [5].

Распределение показателя роста на нефти (нефтьшламе) среди изолятов с различным количеством потребляемых углеводов представлено на рисунке 1 для почвы и рисунке 2 для грунта.

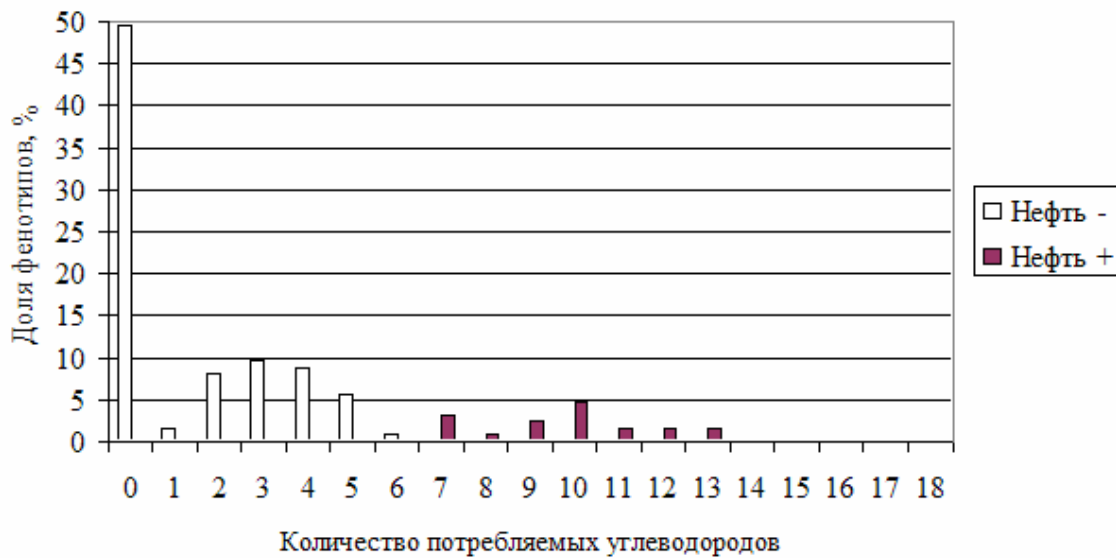


Рисунок 1 – Распределение изолятов, выделенных из почвы, в зависимости от количества потребляемых углеводов и способности к росту на нефти

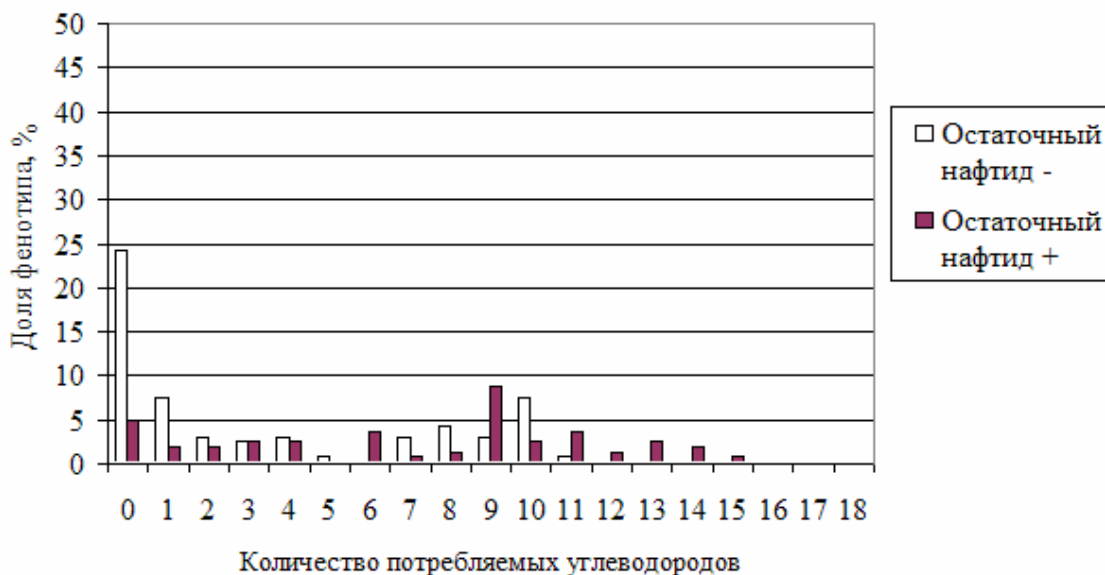


Рисунок 2 – Распределение изолятов, выделенных из грунта, подвергнутого биоремедиации, в зависимости от количества потребляемых углеводов и способности к росту на остаточном нефтиде

На основании полученных данных предположили, что чем большее количество углеводов способен потреблять штамм, тем вероятнее обнаружить способность к росту на нефтепродукте-поллютанте.

Для выяснения такой взаимосвязи применили тест хи-квадрат для таблицы сопряженности, где одна переменная – это способность расти на нефтиде грунта, или нефти в случае почвы, а другая – количество углеводов, на которых росли штаммы. Силу взаимосвязи оценивали с помощью коэффициента неопределенности, результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Статистические показатели для таблицы сопряженности "рост на нефтепродукте-поллютанте" – "количество потребляемых углеводов"

Показатель	Почва	Грунт
Значение теста хи-квадрат и <i>p</i> -уровень для таблицы сопряженности: рост на нефтепродукте-поллютанте - количество потребляемых углеводов	69,0 (<i>p</i> < 0,001)	25,3 (<i>p</i> = 0,046)
Коэффициент неопределенности (переменная "рост на нефтепродукте-поллютанте" зависимая)	1,00	0,25

В обоих случаях получены высокосignимые уровни точности, что позволяет говорить о наличии связи между количеством потребляемых углеводов и способностью расти на нефтепродукте-поллютанте. Важно отметить, что использованные в данном исследовании углеводороды составляют лишь незначительную часть веществ нефтепродуктов, так как отдельные вещества в составе нефтепродуктов редко имеют массовую долю более 1 %. Максимально возможное значение коэффициента неопределенности для почвы отражает возможность предсказать рост штамма на данной нефти с максимальной точностью, основываясь на знании спектра потребляемых углеводов. В случае грунта получено меньшее значение коэффициента неопределенности, и можно предположить, что используемый набор углеводов недостаточно отражает состав остаточного нафтада. Тем не менее и здесь наличие связи подтверждено достаточно убедительно.

Для отбора штаммов по способности к росту на углеводородах имеет смысл ограничить набор субстратов, на которых проводится исследование способности к росту. Рост на различных углеводородах в исследуемых выборках изолятов был распределен асимметрично. Наиболее часто встречался рост на *n*-алканах (от 14,5 % до 33,3 % изолятов для почвы и от 9,4 % до 45,9 % изолятов для грунта), значительно реже на ароматических углеводородах (от 0,0 % до 4,3 % изолятов для почвы и от 5,9 % до 9,4 %

изолятов для грунта). Для поиска минимальной группы субстратов, которая позволяла бы оценивать углеводородокисляющую направленность штамма, использовали метод многомерного шкалирования. Результаты для штаммов, выделенных из чернозема и грунта, представлены на рисунках 3 и 4. В процедуре многомерного шкалирования были получены следующие значения "стресса": для почвы Stress-I = 0,090, Stress-II = 0,195, S-Stress = 0,023, для грунта Stress-I = 0,079, Stress-II = 0,151, S-Stress = 0,010. Такие значения "стрессов" говорят о хорошем качестве отображения взаимосвязей между переменными в пространстве меньшей размерности.

В обоих случаях почти все признаки были распределены довольно хаотично, только н-алканы ряда тридекан – октадекан и ароматические углеводороды образовали отдельные группы. Это означало, что большинство штаммов имели по данным группам углеводородов похожие ответы, и можно рассматривать данные группы углеводородов как единый показатель (важно подчеркнуть вероятностную суть такого показателя).

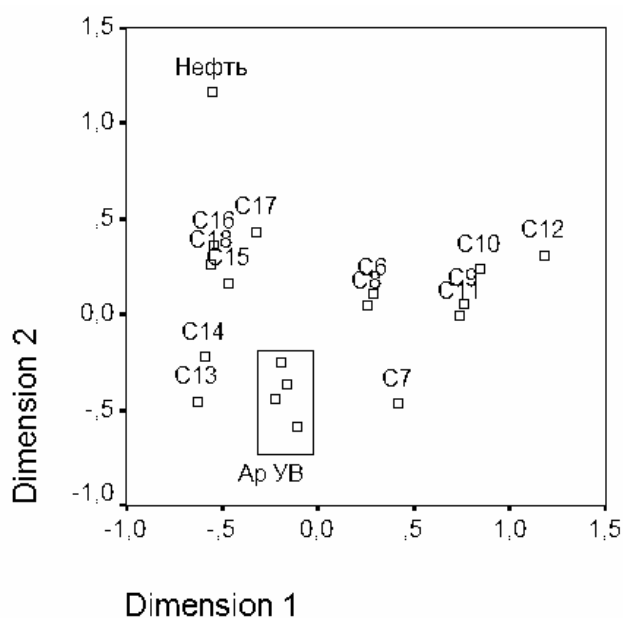


Рисунок 3 – Распределение показателей роста на различных

углеводородах, полученное методом многомерного шкалирования, для штаммов, выделенных из почвы

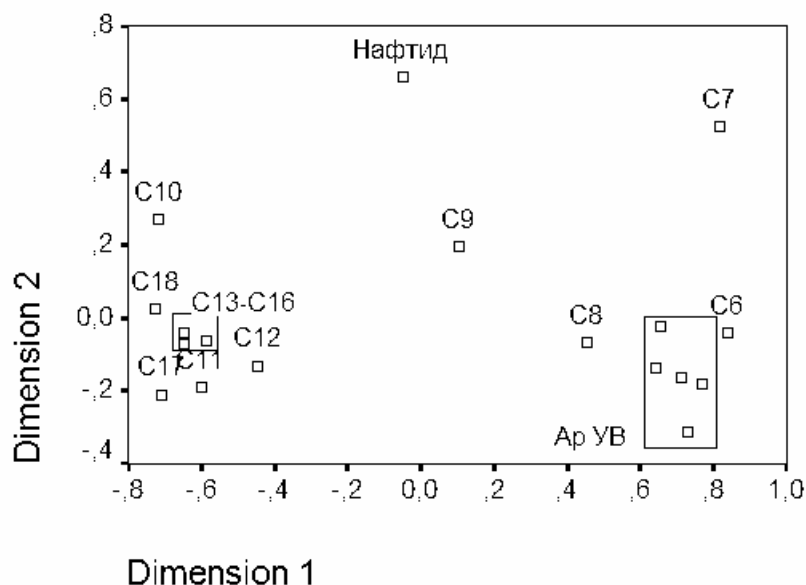


Рисунок 4 – Распределение показателей роста на различных углеводородах, полученное методом многомерного шкалирования, для штаммов, выделенных из грунта, подвергнутого биоремедиации

Так как *n*-алканы ряда тридекан – октадекан наименее летучие и нетоксичные среди всех использованных углеводородов (то есть наиболее удобные для исследовательской работы), и рост хотя бы на одном из них был обнаружен практически у всех углеводородоокисляющих изолятов, мы попытались выяснить, можно ли использовать показатели роста именно на этих углеводородах для оценки возможности роста штаммов на других углеводородах.

Для определения связи между количеством утилизируемых *n*-алканов ряда тридекан – октадекан и количеством потребляемых углеводородов (*n*-алканы ряда гексан – додекан и ароматические углеводороды) использовали коэффициент корреляции рангов Спирмана. Получили следующие значения: R (почва) = 0,40 ($p = 0,001$), R (грунт) = 0,66 ($p < 0,001$). Такие значения

коэффициента корреляции позволяют сделать вывод о возможности использования n-алканов ряда тридекан – октадекан при первичном скрининге углеводородокисляющей микрофлоры. Отсутствие роста на данных углеводородах позволяет исключить штаммы с заведомо малым спектром потребляемых углеводов на ранних этапах отбора штаммов.

Для оценки и сравнения разнообразия спектров потребляемых углеводов у микрофлоры, выделенной из разных источников, было бы логичным использовать какой-либо интегральный показатель. Мы остановили свой выбор на коэффициенте Евклидова разнообразия (EDC), так как этот коэффициент слабо зависит от объема исследуемой выборки и позволяет учесть степень различий между объектами, которые характеризуются множеством показателей. Были получены следующие значения: для почвы $EDC = 0,12$ и для грунта $EDC = 0,18$ (полученные значения составляют примерно треть от максимально возможных при таких объемах выборок штаммов). EDC для нефтешламов №1 и №2, соответственно, равняется 0,00. Эти данные позволяют утверждать, что по характеристике разнообразия трофических возможностей по отношению к углеводородам у гетеротрофной микрофлоры грунт на завершающем этапе биоремедиации не уступал чистой почве и превосходил нефтешламы до очистки.

Благодарности: математическая обработка результатов сделана при содействии профессора кафедры генетики и микробиологии КубГУ доктора биологических наук Волчкова Ю.А. и кандидата биологических наук, доцента Тюрина В.В.

Список литературы

1. Микроорганизмы и охрана почв / Под ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ,

1989. – 206 с.

2. Никитина Е.В. Особенности распределения и физиологического состояния микроорганизмов нефтешлама – отхода нефтехимического производства / Е.В. Никитина, О.И. Якушева, С.А. Зарипов, Р.А. Галиев, А.В. Гарусов, Р.П. Наумова // Микробиология. – 2003. – Том 72. – № 5. – С. 699–706.

3. Рукавцов Б.И. Принципы микробиологической утилизации нефтешламов / Б.И. Рукавцов, Э.В. Карасева, Т.Ю. Нечитайло, И.Е. Гирич, Р.И. Смоляр // Экологические проблемы биodeградации промышленных, строительных материалов и отходов производств: III Всероссийская конференция, сборник материалов. – Пенза, 2000. – С. 129–130.

4. Champely Stephane and Chessel Daniel Measuring biological diversity using Euclidean metrics // Environmental and Ecological Statistics. – 2002. – №9. – p. 167–177.

5. Полянская Л.М. Микронавески ризосферной почвы и лабораторные артефакты / Л.М. Полянская, М.Х. Оразова, О.А. Бурканова, Д.Г. Звягинцев // Микробиология. – 2000. – Том 69. – №4. – С. 581–585.