

СПЕКТРЫ ПОТРЕБЛЯЕМЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ У ГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА РАЗЛИЧНЫХ СРЕДАХ ИЗ ЧЕРНОЗЕМА, ЗАГРЯЗНЕННОГО ТЕНГИЗСКОЙ НЕФТЬЮ

Мельников Д.А. – аспирант

Гирич И.Е. – аспирант

Карасева Э.В. – к. б. н., профессор

Кубанский государственный университет

В статье исследован спектр потребления н-алканов и ароматических углеводородов у гетеротрофных бактерий, выделенных на минеральной среде с нефтью, питательном агаре, среде Эшби, крахмально-аммиачном агаре и среде для целлюлозоразрушающих микроорганизмов из чернозема, загрязненного тенгизской нефтью. На примере исследованной микрофлоры установили четкие различия по ширине спектра потребляемых углеводородов между группами штаммов, способных и, соответственно, не способных к росту на нефти-поллютанте.

Для исследования процесса биodeградации нефтепродуктов в черноземах представляется интересным изучение спектров потребления углеводородов у почвенных микроорганизмов. Известно, что почвенная микрофлора активно участвует в процессах естественной деструкции углеводородов, и численность гетеротрофных микроорганизмов в загрязненной почве может сильнее коррелировать с интенсивностью процесса деградации, чем численность только нефтеокисляющих микроорганизмов [1].

Для выделения и определения концентрации углеводородокисляющих микроорганизмов используют несколько методов. Наиболее простой – посев из разведений почвенной суспензии на плотные минимальные среды с нефтью или индивидуальными углеводородами, например, с гексадеканом

в качестве единственного источника углерода и энергии. Такой способ обеспечивает рост микроорганизмов, способных утилизировать конкретный углеводород.

Нефтепродукты по своему составу являются многокомпонентными веществами, и использование индивидуальных углеводов в качестве единственного источника углерода и энергии не позволяет учитывать микроорганизмы, способные расти на других углеводородах. Применение нефтепродукта-поллютанта в качестве источника углерода и энергии позволяет адекватно оценивать микробный состав нефтеокисляющих сообществ за счет полного отображения спектра углеводов поллютанта. Недостатком такой среды является темная пленка нефти на поверхности пластинки агара, не позволяющая четко дифференцировать типы колоний по культуральным признакам. Это затрудняет выделение максимального количества различных штаммов нефтеокисляющих бактерий. Кроме того, на такой среде сложно культивировать микрофлору, для которой данный нефтепродукт токсичен, но способную деградировать часть углеводов поллютанта.

Чтобы выделить максимальное число штаммов, способных деградировать углеводороды, представляется разумным сочетать оба способа, а именно выделение микроорганизмов на минеральной среде с нефтепродуктом-поллютантом и поиск признаков утилизации углеводов у гетеротрофных микроорганизмов, выделенных на средах без углеводов, где исключено токсическое действие нефтепродукта.

Целью данной работы стала характеристика микроорганизмов, выделенных на разных средах из чернозема, загрязненного нефтью, их способности деградировать углеводороды разного строения, отмечалось также, на каких углеводородах рост был наиболее показательным. В контексте полученных данных проводили сопоставление способности изолятов к дегра-

дации индивидуальных углеводородов различных классов и нефтисполлутанта.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактерии выделяли из четырех одинаковых образцов чернозема, загрязненного тенгизской нефтью в ходе аварии на нефтепроводе Тенгиз-Новороссийск в декабре 2002 года. Образцы были отобраны после перемещения загрязненной почвы на полигон временного хранения.

Выделение и количественный учет микроорганизмов проводили методом десятикратных разведений почвы, суспендированной в физиологическом растворе. Из почвенной суспензии делали посевы на стандартный питательный агар для выделения гетеротрофных микроорганизмов, на среду Эшби для выделения свободноживущих аэробных азотфиксирующих микроорганизмов, на агаризованную среду для целлюлозоразлагающих аэробных бактерий, на крахмально-аммиачный агар и на агаризованную минеральную среду с Российской нефтью (данная нефть используется в качестве стандартной). Состав плотной минеральной среды с нефтью: 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 (водопроводная) до 1 л, нефть добавляли перед розливом в чашки до 1% (об.). Состав среды для целлюлозоразлагающих аэробных бактерий: нитрат натрия – 2,5 г, двузамещенный фосфат калия – 1 г, сульфат магния – 1 г, хлористый кальций – 1 г, хлорид натрия – 0,1 г, карбонат кальция – 2 г, сульфат железа (II) – 2 капли 1 % р-р, карбоксиметилцеллюлоза – 10 г, вода (дист.) до 1 л. Все среды стерилизовали при одной атмосфере 30 минут.

Для оценки способности к росту на различных углеводородах производили посев чистых культур штрихом на плотную минеральную среду (указанного состава) с углеводородами. В качестве единственного источника углерода и энергии использовали индивидуальные n-алканы ряда октан - октадекан (ряд тетрадекан – октадекан использовали в виде равно-

объемной смеси, далее по тексту показатель роста на данной углеводородной композиции учитывается как отдельный признак), бензол (Benz) и его производные – 1,2,4-триметилбензол (псевдокумол – Psk), бутилбензол (b-Benz), о-ксилол (o-Xyl), толуол (Tol) и легкую тенгизскую сернистую нефть. Эта нефть содержалась в образцах чернозема, из которых выделяли микроорганизмы, в концентрации 20–30 г/кг. Все субстраты вносили перед розливом в чашки в расплавленную среду, концентрация 0,2 % (об). Чашки с легкими углеводородами (н-алканы ряда октан – додекан, бензол и его производные) помещали в закрытый эксикатор, на дно которого наливали 10 мл углеводорода. Культивировали при комнатной температуре в течение 7 суток. Учитывали результаты по системе "+" (наличие роста) и "-" (отсутствие роста).

Для поиска отличий в распределении штаммов по количеству деградируемых углеводородов между группами штаммов, способных и не способных деградировать тенгизскую нефть, использовали двухвыборочный критерий Колмогорова-Смирнова. Независимой переменной выступал признак деградации тенгизской нефти, а зависимой переменной считали ширину спектра потребляемых углеводородов. Для измерения взаимосвязи между количеством деградируемых углеводородов 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 группировки признаков деградации углеводородов в зависимости от качественных особенностей спектра потребляемых углеводородов 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. Чем ближе расположены признаки деградации углеводородов в двумерном пространстве по отношению друг к

другу, тем более сходным был ответ большинства штаммов по соответствующим признакам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Черноземные почвы характеризуются высокой концентрацией микроорганизмов, относящихся к разным физиологическим группам [2]. Для оценки роли гетеротрофных микроорганизмов в процессах деградации углеводов проводили исследование содержания микрофлоры данной группы в черноземе, загрязненном тенгизской нефтью. Для данного исследования в чистых культурах выделяли микроорганизмы со среды Эшби, питательного агара, среды для целлюлозоразрушающих микроорганизмов и минеральной среды с нефтью. Все изоляты росли на питательном агаре и отличались друг от друга набором культурально-морфологических признаков.

Для оценки спектра потребляемых углеводов чистые культуры выращивали на плотной минеральной среде с различными углеводородами, а также тенгизской нефтью в качестве единственного источника углерода и энергии. Всего исследовали 74 изолята, которые отличались друг от друга по комплексу культурально-морфологических признаков.

Исследованные штаммы по спектру деградируемых n-алканов были отнесены к трем основным группам: 7 изолятов утилизировали все исследованные n-алканы, 34 изолята были способны к деградации от одного до шести из 7 исследованных n-алканов, 33 изолята не были способны утилизировать n-алканы. Данные по ширине спектра деградируемых n-алканов у штаммов, выделенных на разных средах, приведены в таблице 1.

Основной характеристикой изолята считали спектр потребляемых углеводов или фенотип изолята по спектру потребляемых углеводов. Каждая среда в отдельности позволила выделить меньше фенотипов (уникальных спектров деградации углеводов), чем все среды вместе (отдельные среды от 3 до 22 фенотипов, все среды – 29 уникальных спек-

тров потребляемых углеводов). Особенно важно то, что использование нескольких сред для гетеротрофных микроорганизмов позволило выделить в три раза больше уникальных фенотипов углеводородокисляющих бактерий, нежели при посевах на одну только среду с нефтью. Очевидно, что выделение штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов было бы неполным при использовании только минеральной среды с нефтью.

Таблица 1 – Распределение штаммов, выделенных на разных средах, в зависимости от количества потребляемых n-алканов

Количество потребляемых n-алканов, <i>max</i> = 7	Рост на тенгизской нефти	Количество штаммов, выделенных на различных средах				
		Минеральная среда с нефтью	Питательный агар	Среда для целлюлолитических микроорганизмов	Крахмально-аммиачный агар	Среда Эшби
0	-	6	9	4	5	3
0	+	3	2	0	1	0
1	-	2	1	0	3	0
2	-	0	3	0	0	0
3	-	0	2	1	0	0
3	+	0	2	0	0	0
4	+	1	2	0	0	0
5	+	1	3	1	0	0
6	+	1	7	3	0	1
7	+	4	1	1	0	1
Всего		18	32	10	9	5

Рост на нефти предполагает наличие у бактерий соответствующих ферментных систем для деградации углеводов и механизмов подавления токсического действия нефти. Нефть содержит в своем составе тысячи веществ, и доля немногих из них достигает хотя бы одного процента. Очевидно, что для эффективной деградации нефти штамм должен обладать способностью к компенсации токсического действия поллютанта и быть способным использовать хотя бы часть компонентов нефти в качестве источников углерода и энергии.

Относительно большее значение ширины спектра потребляемых углеводов у данного изолята можно интерпретировать как относительно большие его возможности к потреблению нефтепродуктов-поллютантов. Было высказано предположение о наличии корреляционной связи между способностью деградировать данную нефть и определенными значениями показателя ширины спектра утилизируемых углеводов.

Для оценки значимости различий по ширине спектра потребляемых углеводов между штаммами, деградирующими и не деградирующими нефть-поллютант, использовали двухвыборочный критерий Колмогорова-Смирнова. При вычислении данного критерия, где независимая переменная – это способность деградировать тенгизскую нефть, а зависимая – ширина спектра потребляемых углеводов (н-алканы и ароматические углеводороды), получили следующие результаты. Среднее значение ширины спектра деградации углеводов у штаммов, утилизирующих нефть, – 5,2, а у штаммов, не деградирующих нефть, – 0,53; значение z -статистики двухвыборочного критерия Колмогорова-Смирнова равно 3,31, p -уровень меньше 0,001, что позволяет говорить о высокой степени различия между двумя выделенными группами штаммов по показателю ширины спектра потребляемых углеводов.

В качестве дополнительной проверки различий по ширине спектра потребляемых углеводов между штаммами, способными и не способными к росту на тенгизской нефти, использовали тест хи-квадрат, для измерения взаимосвязи между шириной спектра потребляемых углеводов и способностью к росту на тенгизской нефти использовали коэффициент неопределенности. Были получены следующие результаты. Значение статистики хи-квадрат равно 49,25, число степеней свободы равно 10, $p < 0,001$. Значение коэффициента неопределенности, где зависимая переменная – это способность к росту на тенгизской нефти, равно 0,62 ($p < 0,001$). Можно прийти к выводу о наличии сильной положительной свя-

зи между количеством потребляемых штаммом углеводородов и способностью к росту на тенгизской нефти.

Частоты встречаемости положительных откликов по разным углеводородам были распределены неравномерно, н-алканы ряда C₉-C₁₈ и тенгизскую нефть утилизировали от 37 до 47 % исследованных изолятов, признаки деградации н-октана и ароматических углеводородов встречались значительно реже, менее чем у 13 % исследованных изолятов. Интересно было выяснить, каким образом взаимосвязаны показатели роста на отдельных углеводородах со способностью к росту на нефти. Распределение признаков деградации углеводородов в двухмерном пространстве, полученное методом многомерного шкалирования (рис. 1), отражает такие взаимосвязи.

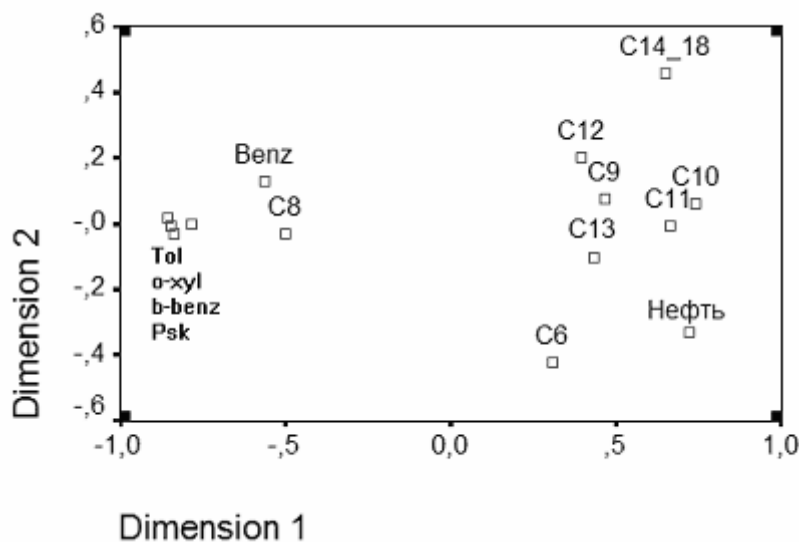


Рисунок 1 – Распределение признаков деградации углеводородов и тенгизской нефти в двухмерном пространстве

Для процедуры многомерного шкалирования получены следующие значения "стрессов": Stress-I = 0,054, Stress-II = 0,103, S-Stress = 0,003. Эти значения позволяют утверждать, что взаимосвязи между переменными (углеводородами) отражены в двухмерном пространстве с достаточным уровнем качества. Рядом с признаком деградации нефти были сгруппиро-

ваны н-алканы ряда нонан – октадекан. Исключение признаков деградации, которые не входили в данную плотную группу, расположенную рядом с показателем роста на тенгизской нефти (Нефть), не влияло принципиально на результаты анализа, проведенного с помощью двухвыборочного критерия Колмогорова-Смирнова и теста хи-квадрат.

Признаки утилизации ароматических углеводородов были сгруппированы в отдельную группу, что говорит о действии некоего фактора, приводящего к разделению признаков деградации углеводородов на две группы. Действительно, рост на ароматических углеводородах выявлен преимущественно у изолятов с широким спектром потребляемых н-алканов, причем штаммы данной группы обязательно росли на тенгизской нефти, кроме штамма К78, который рос на среде с данной нефтью, толуолом и о-ксилолом, но не утилизировал ни один из исследованных н-алканов. Изоляты, способные деградировать ароматические углеводороды, представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Показатели роста изолятов, способных потреблять ароматические углеводороды

Изоляты	Количество деградируемых н-алканов, $max = 7$	Бензол	Толуол	о-ксилол	Бутилбензол	Псевдокумол
К54	7	+	+	+	-	-
К63	7	+	+	+	-	-
К107	7	+	-	-	-	-
К52	7	+	-	-	-	-
М6	7	-	-	-	+	+
К101	6	-	-	-	-	+
К66	6	+	-	+	-	-
К43	6	+	-	-	-	-
К65	6	+	-	-	-	-
К10	6	+	-	-	-	-
К84	5	-	-	+	-	-
К78	0	-	+	+	-	-

Практически все изоляты, которые утилизировали от двух до пяти н-алканов из 7, имели уникальный "разорванный" спектр. Например, штамм К71 деградирует декан, ундекан и тридекан, а штамм К3 – нонан, тридекан и н-алканы ряда тетрадекан – октадекан. Такое распределение положительных показателей роста в ряду н-алканов можно объяснить взаимодействием нескольких факторов: наличием специфичности у ферментов окисления н-алканов по отношению к молекулярному весу углеводорода [3], [4], а также отличиями путей метаболизма жирных кислот с четным и нечетным числом атомов углерода в процессе β -окисления.

Токсичность углеводородов для мембран микроорганизмов имеет сложную зависимость от молекулярного веса н-алкана [5], хотя в целом доступность легких н-алканов, вероятно, выше за счет более высокой скорости диффузии в липофильных средах по сравнению с более тяжелыми углеводородами.

Относительно небольшой набор углеводородов позволил надежно соотнести количество деградируемых углеводородов с показателем роста на нефти-поллютанте, хотя известно, что нефть содержит сотни индивидуальных веществ. Очевидно, для проведения исследований углеводородо-кисляющих сообществ разных местообитаний необходимо изучать способность к росту на углеводородах среди гетеротрофной микрофлоры, выделяемой на средах для микроорганизмов разных физиологических групп. Это дает возможность увеличить разнообразие выделяемой микрофлоры по показателям деградации углеводородов.

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.

Работа поддержана по гранту INTAS 01-2151.

Список литературы

1. Bachoon D.S., Araujo R., Molina M. and Hodson R.E. Microbial community dynamics and evaluation of bioremediation strategies in oil-impacted salt marsh sediment microcosms // *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. – 2001. – V. 27. – P. 72–79.
2. Микроорганизмы и охрана почв / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1989. – 206 с.
3. Smits Theo H. M., Balada S.B., Witholt B. and van Beilen Jan B. Functional analysis of alkane hydroxylases from gram-negative and gram-positive bacteria // *Journal of Bacteriology*. – 2002. – V. 184. – №6. – P. 1733–1742.
4. Van Beilen Jan B., Neuenschwander M., Smits Theo H. M., Roth Ch., Balada S.B. and Witholt B. Rubredoxins involved in alkane oxidation // *Journal of Bacteriology*. – 2002. – V. 184. – №6. – P. 1722–1732.
5. Sikkema J., De Bont Jan A. M. and Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons // *Microbiological Reviews*. – 1995. – V. 59. – №2. – P. 201–222.