

Пархоменко А.Н., Стогниева А.А.Астраханский государственный технический университет, г. Астрахань, Россия
E-mail: parhoman@mail.ru; stognelena@yandex.ru

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ПОЧВ В УСЛОВИЯХ АНТРОПОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

При растущем техногенном влиянии на окружающую среду часто встречается смешанное загрязнение, например различными нефтепродуктами, серой, воздействие которого на микроорганизмы исследовано очень слабо. В то же время известно, что снизить воздействие загрязнителя можно с помощью препаратов на основе аборигенных микроорганизмов. Выделение и изучение свойств таких культур является перспективным направлением. В статье представлены данные по изучению микроорганизмов, выделенных из почв в условиях различного антропогенного воздействия. Объектами исследования являются пробы, отобранные на экспериментальных почвенных участках Астраханского газо-перерабатывающего завода, загрязненные серой и нефтяными углеводородами. В полевых опытах изучено влияние загрязнения почвы нефтепродуктами и серой на численность сапротрофных, олиготрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов. Показано, что высокая численность углеводородокисляющих микроорганизмов на всех этапах эксперимента отражает степень воздействия загрязнения. По сравнению с контролем в загрязненных нефтепродуктами и серой почвах в 400 и 40 раз повышено содержание углеводородокисляющих микроорганизмов в первый месяц после загрязнения. Показано, что выделенные микроорганизмы обладают высокой углеводородокисляющей и эмульгирующей активностью по отношению к нефти, керосину и моторному маслу. Наибольший индекс эмульгирования показан в отношении моторного масла и нефти (92 и 95%). Это может свидетельствовать о высокой адаптации и деструктивной активности микроорганизмов. Полученные результаты свидетельствуют также о возможности разработки биопрепарата на основе выделенных культур для реабилитации почвы, загрязненной нефтью, нефтепродуктами и серой.

Ключевые слова: почва, нефтяное загрязнение, углеводородокисляющие микроорганизмы, эмульгирующая активность, биопрепарат

Крупнейшим из объектов нефтегазовой отрасли в Астраханской области является Астраханский газовый комплекс (АГК), негативное влияние которого на экосистемы прилегающих территорий выражается в загрязнении серосодержащими соединениями, в частности выбросами сероводорода (H_2S), диоксида серы, окислами азота, углеводородами и др. [1]. В результате такого воздействия вокруг АГК сформировался особый техногенный ареал, состоящий из воздушной, водной, почвенной среды и недр.

Оценка состояния и изменения почвенной биоты является одной из важнейших задач мониторинга почв в условиях загрязнения, так как биологические показатели первыми реагируют на антропогенное воздействие и показывают отклонение почвы от нормального состояния и функционирования [9]. Выявленные при этом микроорганизмы, могут обладать повышенной чувствительностью к загрязнителю, или, по своим эколого-функциональным свойствам, представлять ту группу микроорганизмов, которая в большей степени характерна для данной почвы и играет в ней определяющую роль [8].

Основной метод оценки состояния, а также детоксикации и утилизации загрязняющих веществ в нарушенных почвах предполагает исследование микробиологического статуса экосистемы, поскольку наиболее приспособленными к конкретному и специфическому загрязнителю являются аборигенные микроорганизмы [4], на основе которых возможно создание биопрепаратов-деструкторов, приспособленных к определенным экологическим факторам.

В связи с этим, целью исследования являлась оценка влияния загрязняющих веществ на микробиоту экспериментальных почвенных площадок Астраханского газоперерабатывающего завода, а также выделение активных углеводородокисляющих микроорганизмов, перспективных для биоремедиации загрязненных территорий.

Воздействие АГК на окружающую среду связано с выносом токсичных веществ при добыче, переработке и транспортировке пластового газа (содержит до 30% сероводорода, до 15% углекислого газа, 4% меркаптана, конденсат с содержанием серы и пластовую воду с широким спектром макро- и микрокомпонентов) и

продуктов его переработки. На газоперерабатывающем заводе (ГПЗ) из пластового газа получают товарные нефтепродукты: газовую серу, неэтилированный бензин, дизельное топливо и котельный мазут [1], часть которого остается в продукции, а остальная часть попадает в окружающую среду в виде газовых выбросов, сточных вод, отходов.

Объектами данного исследования явились пробы, отобранные на экспериментальных почвенных участках ГПЗ с внесением кормовой серы и нефтяных углеводородов. Изучение влияния нефтяных углеводородов и серы на структуру и функционирование микробных сообществ в почве проводили в течение 6 месяцев стандартными и общепринятыми методами [7]. Ежемесячно отбирали пробы почвы для микробиологического анализа на контрольных и загрязненных участках.

Также рассчитали относительную численность (V) микроорганизмов в загрязненной и контрольной почвах [5], [6]. Данный показатель позволяет отделить влияние сопутствующих факторов от влияния загрязняющих веществ, так как варианты контрольной почвы в полевых опытах находились в тех же условиях, что и загрязненные. Полученные данные подвергались статистической обработке с помощью программы Microsoft Excel for Windows.

Общая численность микроорганизмов достаточно четко отражает микробиологическую активность почвы, скорость разложения органических веществ и круговорота минеральных элементов [8]. Этот показатель в исследуемый период при загрязнении нефтяными углеводородами варьировал в пределах $1,5 \cdot 10^5 - 1,5 \cdot 10^6$

КОЕ/г, при загрязнении серой – не превышал $1,34 \cdot 10^5$ КОЕ/г, что по шкале численности бактерий характеризует их как «бедные» и «очень бедные» [3].

Изменение относительной численности (V) исследуемых групп микроорганизмов показало различия в реакции микробиоценоза на характер загрязнения: при внесении нефтяных углеводородов первыми реагировали углеводородокисляющие и сапротрофные микроорганизмы, численность которых в первый месяц загрязнения превышала контроль в 400 и 5,5 раз соответственно (рис. 1а). При загрязнении серой, напротив, наблюдали подавление развития всех исследуемых групп микроорганизмов на всех этапах эксперимента, за исключением углеводородокисляющих, численность которых в 40 раз превышала контрольные значения в первый месяц загрязнения и в 583 раза через 4 месяца экспозиции (рис. 1б).

Известно, что нефтяное загрязнение снижает видовое разнообразие микроорганизмов за счет отбора немногочисленных видов с повышенной метаболической активностью [5]. Повышение численности и активности углеводородокисляющих микроорганизмов, по мнению ряда авторов [6], [8], является объективным индикатором состояния микробиоценозов почв, так как в условиях загрязнения большую выживаемость и увеличение доли в микробном сообществе имеют штаммы, способные к адаптации и перестройке ферментного аппарата.

Экспериментально установлено, что поступление загрязняющих веществ меняет условия существования микроорганизмов, вызывает перестройку микробного сообщества

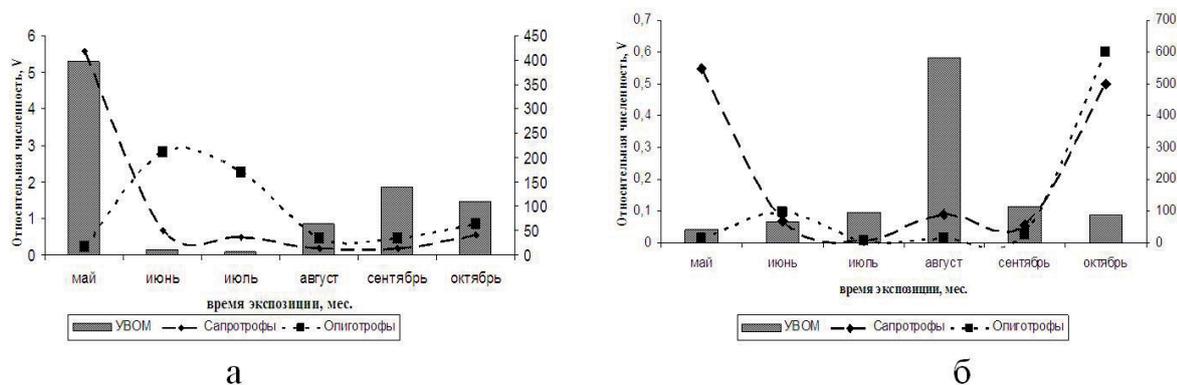


Рисунок 1 – Динамика численности микроорганизмов в почве полевых экспериментальных площадок АГК: а – при внесении нефтяных углеводородов; б – при внесении серы

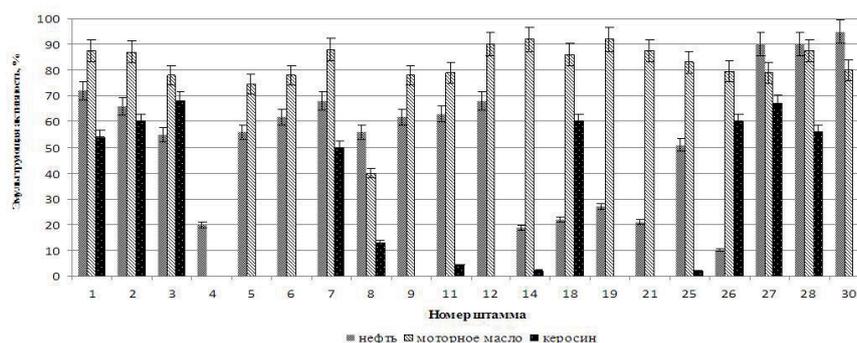


Рисунок 2 – Эмульгирующая активность культур по отношению к нефти, моторному маслу и керосину

в исследуемых почвах. Так, на разных этапах эксперимента доминировали микроаэрофильные и аэробные палочковидные спорообразующие бактерии и микромицеты родов *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*.

Также на всех этапах эксперимента выделяли чистые культуры углеводородокисляющих микроорганизмов, изучали их свойства. В результате первичного скрининга методом лунок в отношении сырой нефти [7] выявлено 25 штаммов, проявляющих наиболее выраженную углеводородную активность.

Углеводородразрушающую способность мицелиальных культур оценивали на среде Чапека без сахарозы, содержащей 1 % бензина, керосина, дизельного топлива и моторного масла с добавлением индикатора бромтимолового синего. Изменение окраски среды растущей культурой за счет выделения продуктов метаболизма служит оценкой ее активности [6]. В результате установлено, что наиболее активным в отношении всех нефтепродуктов является штамм № 20 (*Aspergillus sp.*). Остальные микромицеты и дрожжеподобные грибы показали слабый рост только на среде с моторным маслом и бензином, при этом отсутствие изменения цвета среды говорит о слабом протекании процесса деструкции.

Важными бактериальными метаболитами являются биосурфактанты (биоПАВ), которые способны повышать биологическую доступность углеводородов, переводя их в водную фазу [2], [14], а также модифицировать внешние поверхности бактерий путем их гидрофобизации [11], [13], [15]. Оценку способности микроорганизмов синтезировать биосурфактан-

ты проводили по индексу эмульгирования [10]. В качестве гидрофобного субстрата использовали бензин, керосин, дизельное топливо, нефть и моторное масло. Наиболее низкие значения индекса эмульгирования в эксперименте отмечены при использовании бензина и дизельного топлива. Практически все исследуемые культуры на таких субстратах, как керосин, моторное масло и нефть показали индекс эмульгирования выше 50 %, что является показателем высокой продукции биоПАВ [2], [12]. Лучшие показатели индекса эмульгирования отмечены с керосином у штаммов № 3 и № 27 (68%), моторным маслом (80–92% у 10-ти культур) и нефтью (90–95%) у штаммов № 27–28, № 30 (рис. 2).

Таким образом, исследование микробиоты экспериментальных почвенных участков ГПЗ, загрязненных серой и нефтяными углеводородами, показало значительное увеличение численности углеводородокисляющих микроорганизмов на всех этапах и во всех вариантах эксперимента. Перестройка ферментного аппарата микроорганизмов способствует их выживаемости и адаптации, причем максимум численности углеводородокисляющих микроорганизмов отмечен через месяц после внесения нефтяных углеводородов и через 4 месяца после внесения серы.

Полученные данные по изучению углеводородокисляющей активности и высокие показатели индекса эмульгирования в отношении различных нефтепродуктов, свидетельствуют о перспективности выделенных культур, на основе которых, в дальнейшем, возможно создание биопрепаратов-деструкторов, приспособленных к определенным экологическим условиям.

20.09.2017

Список литературы:

1. Андрианов В.А. Геоэкологические аспекты деятельности Астраханского газового комплекса. Астрахань: Изд-во АГМА. 2002. 245 с.
2. Бектурова А.Ж., Масалимов Ж.К. и др. Эмульгирующая активность некоторых углеводородокисляющих микроорганизмов // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2013. – №3/1 (59). – С. 56-58.
3. Звягинцев Д.Г. Биологическая активность почв и шкалы для оценки некоторых ее показателей // Почвоведение. – 1978. – №6. – С. 48-54.
4. Кайырманова Г.К., Жубанова А.А., Ерназарова А.К. и др. Получение микробных ассоциаций, используемых для биоремедиации нефтеотходов месторождения «Жанажол» // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2014. – №1/2 (60). – С. 240-243.
5. Киреева Н.А., Водопьянов В.В., Мифтахова А.М. Влияние нефтяного загрязнения на целлюлазную активность почв // Почвоведение. – 2000. – №6. – С. 748-753.
6. Киреева Н.А., Водопьянов В.В., Мифтахова А.М. Биологическая активность нефтезагрязненных почв. Уфа: Гилем. 2001. 376 с.
7. Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и др. М.: Академия. 2005. 608 с.
8. Саксонов М.Н., Абалаков А.Д., Данько Л.В. Экологический мониторинг нефтегазовой отрасли. Физико-химические и биологические методы. Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та. 2007. 114 с.
9. Язиков Е.Г., Шатилов А.Ю. Геоэкологический мониторинг: учебное пособие. Томск. 2003. 336 с.
10. Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surface active agents from two Bacillus species // Appl. Environ. Microbiol. – 1987. – Vol.53, № 2. – P. 224-229.
11. Ganesh A. and Lin J. Diesel degradation and biosurfactant production by Gram-positive isolates // African Journal of Biotechnology. – 2009. – V.8 (21). – P. 5847-5854.
12. Jaysree R.C., Subham B., Priyanka P.S. Isolation of biosurfactant producing bacteria from environmental samples // Pharmacology online. – 2011. – V. 63. – P. 1427-1433.
13. Kosaric N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation // Food Technol. Biotechnol. – 2001. – V.39. – P. 295-304.
14. Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil // Engineering Geology. – 2001. – V.60. – P. 371-380.
15. Zhang Y., Miller R.M. Effect of rhamnolipid (biosurfactant) on solubilization and biodegradation of n-alkanes // Appl. and Environ. Microbiol. – 1995. – Vol.61. – P. 2247-2251.

Сведения об авторах:

Пархоменко Анна Николаевна, доцент кафедры прикладной биологии и микробиологии
института рыбного хозяйства, биологии и природопользования
Астраханского государственного технического университета, кандидат биологических наук
E-mail: parhoman@mail.ru

Стогниева Анастасия Александровна, магистрант кафедры прикладной биологии и микробиологии
института рыбного хозяйства, биологии и природопользования
Астраханского государственного технического университета
E-mail: stognelena@yandex.ru
414025, Россия, г. Астрахань, ул. Татищева, 16