

Конурбаева М.У.

УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ КУЛЬТУР PSEUDOMONAS FLUORESCENS В ПОЧВЕ (модельные опыты)

M.U. Konurbaeva

THE STUDY OF PSEUDOMONAS STRAINS ABILITY IN BIODEGRADATION OF OIL PRODUCTS IN THE soil (model test)

УДК: 502.654:678.019.31

Исследовали нефтеокисляющий потенциал штамма бактерии *Pseudomonas fluorescens* ISS-4. Провели модельные опыты с двумя типами почв: луговой серозем и темно-каштановый, с разными вариантами опыта. Из двух исследованных почв наиболее благоприятные условия для развития интродуцента обнаружены в темно-каштановом типе почв. Менее активное размножение внесенных живых клеток псевдомонад и окисление бензина в луговом сероземном типе почвы. С помощью интродукции углеводородоокисляющих микроорганизмов можно существенно интенсифицировать процесс разложения бензина.

Ключевые слова: *Pseudomonas*, нефтеокисляющая способность, ПДК, почва.

Oil oxidizing ability of Pseudomonas fluorescens ISS-4. The model test was hold with two soils: meadow-, dark-, with different variant. From the two researching soils more favorable condition for increasing Pseudomonas founded in the dark-, type of soils. With the help of introduction, oil oxidizing microorganism will make intensification process in decomposing gasoline.

Key words: *Pseudomonas*, oil oxidizing ability, LAC, soil.

Современная биотехнология предусматривает процесс микробной интродукции - внесение в природные среды (почву, грунты, водоемы, филлосферу растений) микроорганизмов с той или иной полезной функцией. Наиболее широко в настоящее время данный подход применяется для очистки природных объектов от нефтяных загрязнений, пестицидов и некоторых других поллютантов [2,3,5].

Экологически безопасной является очистка окружающей среды от загрязнения нефтепродуктами с помощью биопрепаратов, созданных на основе естественной, сапрофитной микрофлоры, присутствующей в воде или в почве.

Для успешного применения биопрепарата в природной среде, нужно изучить его популяционную динамику, исследовать приживаемость штамма, сохранность деструктивной способности, после интродукции микроба в природную среду, какова способность окисления нефтепродукта в естественной среде.[4].

Методы и объекты исследования.

Тесты. Для изучения нефтеокисляющей способности штамма в модельных образцах проводили опыты в течение трех месяцев. Показатели:

- 1) дыхательная активность почвенных образцов (CO₂);
- 2) весовой метод содержания углеводорода в почвенных образцах;
- 3) влияние интродуцента на аборигенную микрофлору;
- 4) популяционная динамика штамма *Pseudomonas fluorescens* ISS-4.

Организм. Культура бактерии рода *Pseudomonas fluorescens* ISS-4.

Объект. Два типа почв с разными вариантами (табл.1).

Таблица 1

№	Варианты опыта.
1.	луговой серозем, бензин в 1000 раз > ПДК
2.	луговой серозем, контроль + <i>Pseudomonas</i>
3.	луговой серозем, контроль
4.	луговой серозем, бензин в 1000 раз > ПДК + <i>Pseudomonas</i>
5.	Темно-каштановый, контроль + <i>Pseudomonas</i>
6.	Темно-каштановый, бензин в 1000 раз > ПДК
7.	Темно-каштановый, контроль
8.	Темно-каштановый, бензин в 1000 раз > ПДК + <i>Pseudomonas</i>

1). Проводился учет выделения CO₂ из почвенных образцов, загрязненных нефтепродуктами (модельные образцы) ацидометрическим методом, в течение месяца [1].

2). Количественное определение остаточного бензина проводили весовым методом. Для этого после окончания роста содержимое колб подвергали экстракции хлороформом. Пробы культуральной жидкости и контроля объемом по 100 мл экстрагировали встряхиванием с 50 мл хлороформа в течение 30 мин. Хлороформный экстракт отделяли центрифугированием в течение 30 мин. При 4000 об/мин и высушивали в стакане над 3 г безводного сульфата натрия. Аликвоты (5 мл) хлороформного экстракта переносили в предварительно взвешенные с точностью до 0,0001 г градуированные пробирки объемом 10 мл. Для удаления хлороформа пробирки в положении под углом 45° помещали в вентилируемый термостат при 70 -75° С на 3,5 – 4 ч, выдерживали при 35 – 40° С в течение ночи и взвешивали (P_i). Оценка нефтеразлагающей

активности (А) весовым способом осуществлялась с учетом данных, полученных для контроля:

$$A(\%) = (P_{\text{контр}} - P_i) / (P_{\text{контр}} * 100)$$

3). Влияние интродуцента (культура *Pseudomonas fluorescens* ISS-4) на аборигенную микрофлору проводили количественный контроль роста микроорганизмов методом предельных разведений с высевом на чашки Петри с МПА и последующим подсчетом колоний.

4). Популяционная динамика псевдомонад интродуцированных в нефтезагрязненную почву. Для исследования динамики псевдомонад проводили вышеуказанным методом.

Результаты и обсуждение.

Дыхательная активность и разложение бензина. В течение одного месяца, каждые 10 дней, изучали интенсивность дыхания почв.

На рис.1 представлена динамика интенсивности дыхания в лугово-сероземном типе почвы.

На протяжении всего опыта интенсивность дыхания (I_d) контрольной незагрязненной почвы оставалась крайне низкой и практически постоянной. Внесение бензина вызывало резкое увеличение I_d с достижением максимума от 1 до 1,4 $\text{мг С-СО}_2 / (\text{г почвы})$ на 20 сутки опыта. Затем I_d снижалась до более или менее постоянного уровня 0,33 $\text{мг С-СО}_2 / (\text{г почвы})$, существенно превышающего I_d контроля (почва без бензина) на протяжении всего срока наблюдения. Наибольшая скорость окисления бензина отмечена в темно-каштановом типе почвы, наименьшая – в сероземно-луговом типе.

Судя по кривой динамики дыхания, их одномоментное содержание в исходной бензина относительно невелико, и они практически полностью потребляются уже в первые 10 дней опыта (период первоначальной стимуляции дыхания обогащенной почвы), затем процесс деградации протекает в квазистационарном режиме при постоянной I_d . Очевидно, что в этом режиме убыль доступных окислению субстратов должна восполняться в результате медленного, но непрерывного процесса деградации бензина.

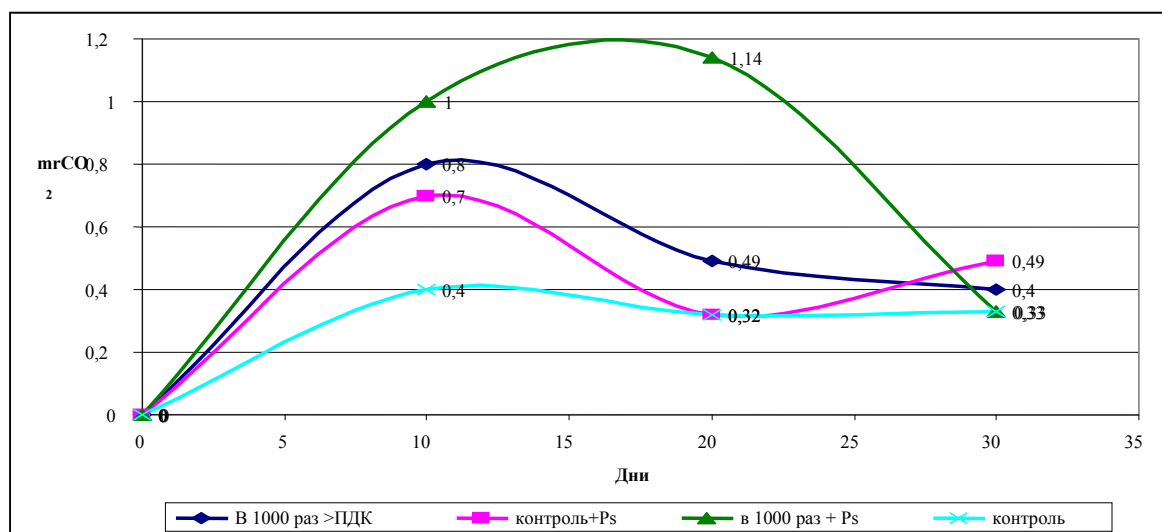


Рис. 1. Динамика интенсивности дыхания почвы, загрязненной нефтью (луговой серозем).

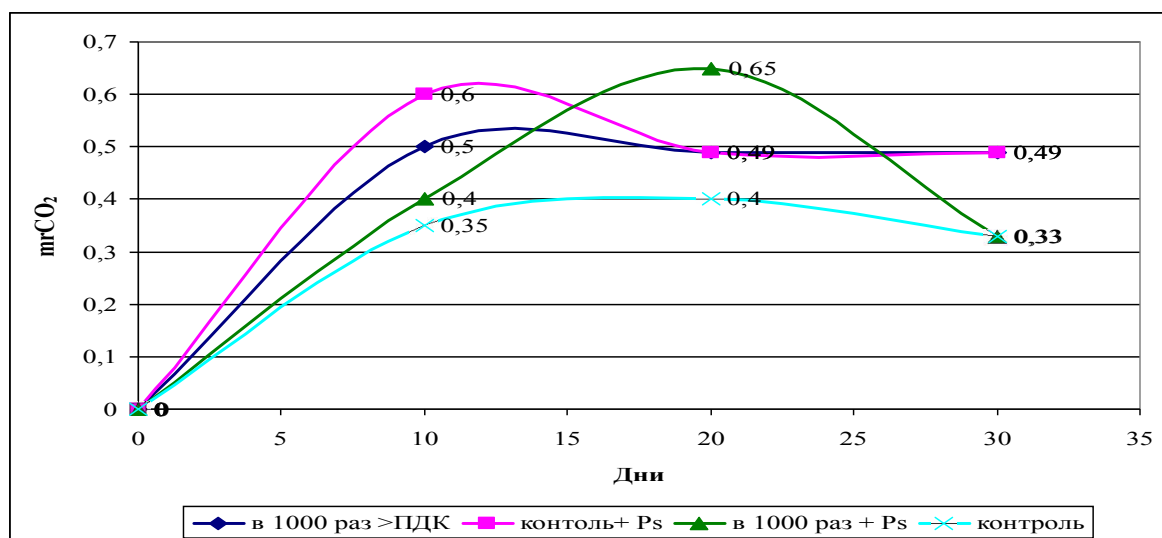


Рис. 2. Динамика интенсивности дыхания почвы, загрязненной нефтью (темно-каштановый тип).

Интродукция псевдомонад приводила к ещё большему увеличению I_d . В обоих типах почвы отмечено двухкратное повышение максимального значения I_d на 20 сутки, в особенности в лугово-сероземном типе почвы. Затем на 30 сутки наблюдается резкое потухание, соответствующее значению максимальной активности в варианте без интродукции.

В варианте с внесением псевдомонад в незагрязненную почву обнаружено быстрое затухание активности после небольшой вспышки дыхания на 10 сутки. В данном варианте опыта основным источником CO_2 очевидно, служила биомасса внесенных псевдомонад. В отсутствие питательных субстратов происходит автолиз и эндогенный распад клеток, а также их выедание животными-хищниками. Пик I_d на 10 сутки, вероятно, соответствует максимуму размножения последних. I_d незагрязненной почвы с внесенным интродуцентом незначительно различалась в зависимости от типа почвы (рис.2).

Показатели I_d разных вариантов опыта были не схожи друг с другом. В частности, I_d варианта «почва+бензин+псевдомонады» достоверно превышала I_d суммы: «почва+бензин» + «почва+псевдомонад» + «почва». Это свидетельствует, о том, что внесенные псевдомонады действительно окисляют и используют бензин на рост, причем значительная часть определяемого диоксида углерода является конечным продуктом окислительной деградации бензина.

Весовой метод. Одним из достоверных показателей является весовой метод содержания углеводов.

В темно-каштановом типе почвы начальное загрязнение составляло 500мг/кг почвы. После трех обработок, в начале каждого месяца в концентрации живых клеток псевдомонад 10^9 ,

количество бензина в почвенных образцах составляло 37,0 мг/кг, и степень очистки составила за один сезон 92,6 %.

Таблица 2

Динамика очистки биопрепаратом загрязненных почвенных образцов темно-каштанового типа почв (модельные образцы).

Почва (объект), сутки	Содержание бензина, %	Степень очистки, %	Содержание бензина, мг/кг почвы.
0	100	0	500
10	30,4	69,6	150,4
30	8,6	91,4	43,2
90	7,4	92,6	37,0

В лугово-сероземном типе почвы начальное загрязнение – 500 мг/кг почвы. За три месяца количество бензина сократилось в 9 раз, оно составляло 57,0 мг/кг почвы, степень очистки составила 88,6 %.

По сравнению с темно-каштановым типом почвы окисление в лугово-сероземном типе почвы происходила медленнее.

Таблица 3

Динамика очистки биопрепаратом загрязненных почвенных образцов лугово-сероземного типа почв (модельные образцы).

Почва (объект), сутки	Содержание бензина, %	Степень очистки, %	Содержание бензина, мг/кг почвы.
0	100	0	500
10	52,4	47,6	262,0
30	12,7	87,3	64,3
90	11,4	88,6	57,0

Влияние интродуцента на аборигенную микрофлору почв. Данные представлены на рис.3. В обеих почвах это влияние проявляется в форме стабилизации бактериального сообщества. В темно-каштановом типе почв интродукция псевдомонад вначале стимулировала рост бактерий, затем численность бактерий установилась на уровне, который был низок, но был выше, по сравнению с контрольными вариантами.

В сероземе в первую неделю инкубации обнаруживалось явление, напоминающее конкуренцию: внесенный микроорганизм подавлял рост

собственно почвенных бактерий. Однако затем численность последних стабильно возрастала на протяжении всего периода наблюдения и, в конце концов, превысила аналогичный показатель для контрольного варианта «почва+бензин». В загрязненном с бензином темно-каштановом типе почвы без интродуцента стабилизация численности бактерий в аборигенном микробном сообществе произошла на более высоком уровне, чем у другого типа почв, что, вероятно, объясняет повышенную скорость окисления бензина, отмеченную ранее (рис.3).

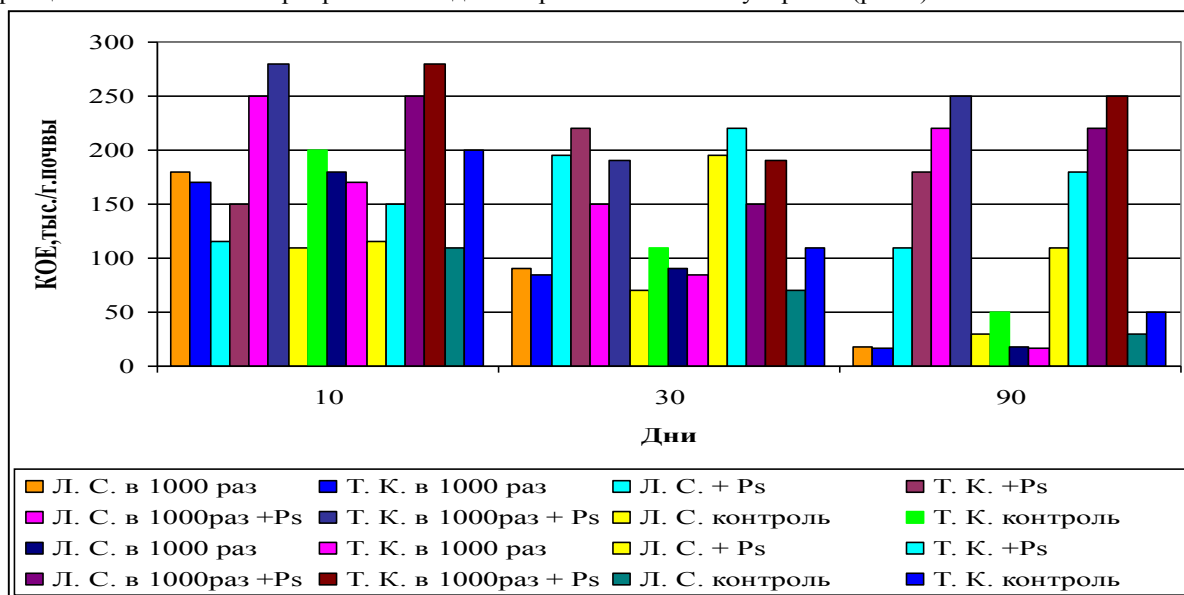


Рис. 3 Динамика численности аборигенной микрофлоры.

Популяционная динамика интродуцента.

В обоих загрязненных типах почв наблюдается два этапа популяционной динамики:

- 1) взрывной рост внесенных микроорганизмов с последующим столь же резким падением численности;
- 2) период стабилизации численности на почти постоянном уровне (рис.4).

Различия между почвами сводились к следующему: наибольшая амплитуда перепада показателей численности псевдомонад была обнаружена в темно-каштановом типе почв.

В незагрязненных почвах независимо от их типа популяционная динамика носила сходный

монотонный характер (рис.4). Численность псевдомонад составляла $18 \cdot 10^5$ за первые 10 дней опыта, по истечении срока опыта падала до недетектируемого уровня (менее 10^3 кл/г почвы). Данные результаты подтверждают с ранее установленным фактом быстрого элиминирования нефтеокисляющих псевдомонад после их попадания в незагрязненную почву [3]. Это свойство исследуемой культуры псевдомонад исключает побочный отрицательный эффект от интродукции – микробное загрязнение окружающей среды.

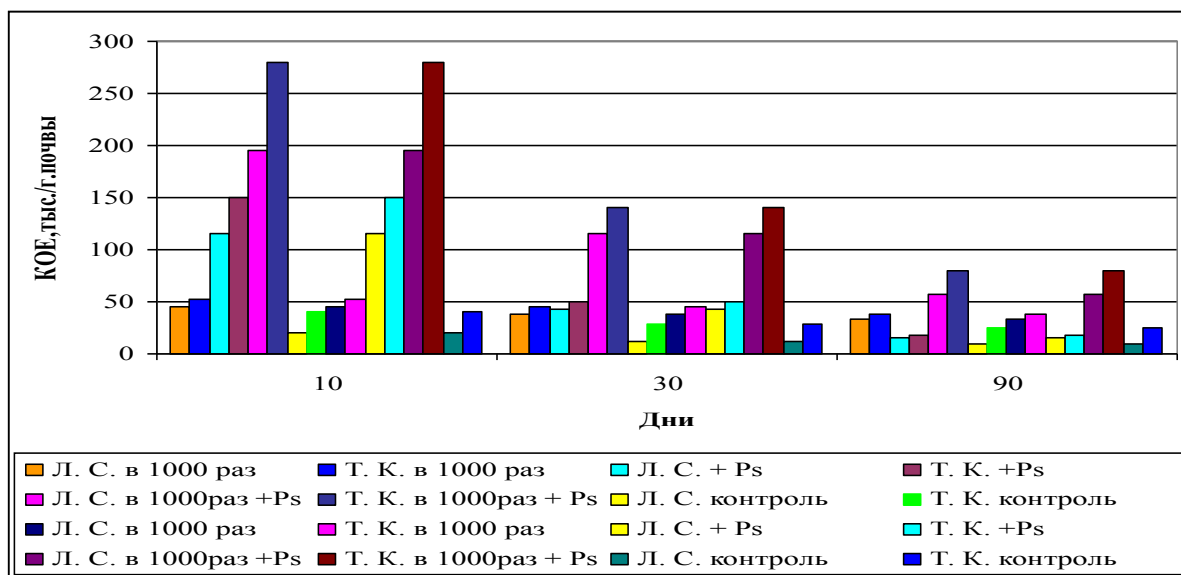


Рис.4 Динамика популяции бактерий Pseudomonas.

Вывод: Из двух исследованных почв наиболее благоприятные условия для развития интродуцента обнаружены в темно-каштановом типе почв. Менее активное размножение внесенных живых клеток псевдомонад и окисление бензина в луговом сероземном типе почвы, связано, видимо, с неблагоприятными условиями аэрации, вызванными её слабой структурированностью и тяжелым механическим составом.

С помощью интродукции углеводородокисляющих микроорганизмов можно существенно интенсифицировать процесс разложения бензина. В незагрязненной почве интродуцент быстро элиминируется, что является благоприятным свойством, так как исключает

вероятность побочного эффекта интродукции – микробного загрязнения окружающей среды.

Литература:

1. Аринушкина Е.В. Руководство по химическому анализу почв./Е.В.Аринушкина - М.: Изд-во Моск. ун-та, 1961. - 140с.
2. Васильева Л.В. Диссипотрофы в микробном сообществе. //Л.В.Васильева, Г.А.Заварзин // Микробиология. - 1995. -Т. 64, № 2. - С. 239-244.
3. Пути восстановления нефтезагрязненных почв черноземной зоны Украины./ А.Я.Демиденко, В.М.Демурджан - М.: Наука, 1988. – 197с.
4. Hugh R. Pseudomonas maltophilia, an alcaligenes-like species / R.Hugh, E.Ryschenkow //J. Gen.Microbiol. - 1961. – Vol.26. N 1. - P. 123—132.
5. Metzner H. // Forh. Und Berat.1989. №46. S.171.

Рецензент: д.с/х.н., профессор Карабаев Н.А.