

СЕКЦИЯ
«НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОЦЕНКИ
И РЕГЛАМЕНТАЦИИ ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ.
ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ»

УДК 579.26

ВЫДЕЛЕНИЕ И СКРИНИНГ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ
УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ

Алимова Б.Х., Сайлиев М.У., Шарипов М.Р., Пулатова О.М.,
Махсумханов А.А., Давранов К.Д.

Институт микробиологии Академии наук Республики Узбекистан,
г. Ташкент, Республика Узбекистан
balimova@list.ru

Выделены штаммы углеводородоокисляющих микроорганизмов из «ловушки» по сбору перекаченной нефти со скважины (PS) KARIM Кашкадарьинской области. Выделенные микроорганизмы окисляют компоненты сырой нефти и могут быть рекомендованы в составе биопрепаратов-деструкторов нефти и нефтепродуктов. в результате скрининга 15 штаммов-деструкторов углеводородов нефти на основании детального анализа их свойств отобрано 2 наиболее эффективных штамма, способных к деструкции нефти и синтезу биосурфактантов. Штаммы принадлежат к родам *Rhodococcus*, *Acinetobacter*. Наибольший процент деструкции наблюдался для штамма *Acinetobacter junii* K2/6/1, *Acinetobacter venetianus* K2 5/2 м, *Rhodococcus ruber* R4/3 (48,2, 47,3 и 47,7 %, соответственно).

Ключевые слова: накопительная культура, бактерии, штамм, нефтедеструкторы, окисление, индекс эмульгирования, биопрепарат.

Введение. Развитие нефтяной промышленности приводит к загрязнению объектов окружающей среды токсичными для живых организмов компонентами нефти и нефтепродуктами. Для решения этих проблем разработка эффективных и безопасных способов очистки с использованием биопрепаратов на основе микроорганизмов является актуальным.

В настоящее время для очистки нефтяных загрязнений используются биологические препараты, включающие в себя клетки микроорганизмов-деструкторов, которые используют нефтяные углеводороды в качестве источника углерода и энергии, это свойство микроорганизмов нефтедеструкторов связывают с наличием у них ферментной системы оксигеназ, позволяющие им включать молекулярный кислород непосредственно в углеводород, образуя при этом окисленные соединения. В результате этого углерод из нефти и нефтепродуктов частично преобразуется в углекислый газ, метан, частично переходит в биомассу клеток, частично трансформируется в гумус и закрепляется в почве. Анализ литературных данных показывает, что биопрепараты на основе штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов подразделяются на две основные группы: биопрепараты на основе монокультур и биопрепараты в состав которых входит несколько штаммов

микроорганизмов, основным критерием оценки которых является эффективность утилизации нефтяного загрязнения [1-3].

Целью работы является выделение активных штаммов бактерий-деструкторов углеводов нефти и создание на их основе ассоциации для биопрепарата деструктора нефти и нефтепродуктов.

Материалы и методы исследований. В работе использовали образцы почв и воды, взятые с «ловушки» по сбору перекаченной нефти со скважины (PS) KARIM Кашкадарьинской области. Выделение микроорганизмов деструкторов нефти проводили методом накопительной микробной культуры на синтетической среде Раймонда с добавлением сырой нефти в концентрации 2 %, всего было взято пять образцов из различных мест. Для этого в колбы Эрленмейера вносили жидкую среду в количестве 100 мл с добавлением 10 г образца. Культивирование на жидкой среде Раймонда проводили при температуре 28 °С в стационарных условиях. Рост накопительной микробной культуры устанавливали визуально по помутнению среды. Количественный состав, выделение и получение чистых культур бактерий из накопительных микробных культур, в которых наблюдалась активная деструкция нефти в течение 5-7 дней, осуществляли методом Коха с предварительным последовательным разведением. Для выделения чистых культур использовали питательный агар (HiMedia, Индия). Посев осуществляли через 7 и 14 сутки экспозиции накопительных микробных культур. Чистые культуры доминирующих бактерий, выросших на чашках Петри, выделяли по методу Коха из отдельных колоний. Чистоту выделенных культур оценивали визуально и микроскопированием препаратов окрашенных фиксированных клеток. Изучение морфолого-культуральных признаков проводили общепринятым методам [4].

По спектру рибосомальных белков на МАЛДИ-ТОФ-МС (Bruker Daltonics, Германия) для некоторых штаммов определена их видовая принадлежность.

Для скрининга выделенных чистых культур микроорганизмов на способность деструктировать нефть, штаммы культивировали в пробирках в жидкой среде Раймонда в объеме 10 мл, в течение 10-15 дней, при температуре 28 °С, с содержанием нефти 1% плотностью 932 кг/м³ при 20 °С. Нефть вносили в стерильных условиях предварительно стерилизовав в автоклаве в течении 30 минут при 0,5 атм. В качестве посевного материала использовали суспензию клеток бактерий, выращенных предварительно на триптон соевом бульоне (HiMedia, Индия) в течении 48 часов. Контролем служила среда Раймонда с 1% нефтью, без добавления суспензии клеток.

Деструкцию нефти исследуемыми штаммами оценивали по суммарному показателю убыли нефти в жидкой среде. Определяли весовым методом по формуле:

$$D (\%) = ((P_k - P_i) / P_k) \times 100 \%,$$

где P_k – контроль без микроорганизма; P_i – экспериментальный образец.

Индекс эмульгирования определяли по методике [5]. В мерную пробирку к 4,0 мл полученной пробы добавляли 2,0 мл гидрофобного субстрата (дизельное топливо). Полученную смесь интенсивно перемешивали в течение 2 мин и оставляли на 24 ч при комнатной температуре. Индекс эмульгирования рассчитывали через 24 ч по формуле:

$$E_{24} = (V_s / V) \times 100 \%,$$

где V_3 – объем плотной эмульсии, образуемой при перемешивании изучаемого раствора с дизельным топливом, мл; V – общий объем раствора, мл.

Результаты и их обсуждение. Проблема ликвидации нефтезагрязнений успешно решается методами биоремедиации, основанными на применении микроорганизмов-деструкторов углеводородов, входящих в состав биопрепаратов. При этом ключевую роль в процессах преобразования загрязняющих веществ выполняют аборигенные микроорганизмы с высокой адаптационной способностью [6]. В этой связи, выделение и получение чистых культур микроорганизмов деструкторов нефти проводили из накопительных микробных культур (5 образцов), взятых из «ловушки» по сбору перекаченной нефти, со скважины (PS) KARIM Кашкадарьинской области (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика мест выделения

№ образца	Место выделения
1	Загрязнённая нефтью почва вокруг «ловушки» через 3 дня после слива нефти
2	Загрязнённая нефтью почва вокруг «ловушки» через 3 дня после слива нефти
3	3 месячное загрязнение «ловушки» водная фракция
4	Образец из заболоченного места «ловушки»
5	3 месячное загрязнение образец воды со дна «ловушки»

В процессе культивирования в течении 5-7 суток в образцах №3, №4, №5 наблюдался слабый рост и развитие микроорганизмов, соответственно и степень деструкции нефти была незначительной. Однако, активный рост и деструкция нефти за этот период инкубации наблюдалась в образцах №1 и №2. Следует отметить, что наиболее высокой уровень деструкции нефти наблюдалось в образце №2, и уже на третьи сутки на поверхности питательной среды нефти не было обнаружено. Учитывая интенсивную деструкцию нефти этим сообществом микроорганизмов, выделение микроорганизмов деструкторов нефти осуществляли из этого образца.

В процессе работы было выделено в чистую культуру 15 штаммов бактерий и дрожжей: представленные грамположительными и грамотрицательными формами, относящиеся к родам *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Dienzia*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Candida*.

По спектру рибосомальных белков на МАЛДИ-ТОФ-МС (Bruker Daltonics, Германия) определена их видовая принадлежность. В таблице 2 представлено родовое и видовое разнообразие выделенных штаммов.

Отмечается тенденция к накоплению в нефтезагрязненном образце потенциально опасных для человека и животных видов бактерий.

Исследования по деструкции нефти чистыми культурами микроорганизмов показало, что наиболее хорошими деструкторами оказались бактерии, относящиеся к роду *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Dienzia*, *Candida*, процент деструкции нефти для этих штаммов через 10 дней культивирования составил более 40 % (рисунок). Наибольший процент деструкции наблюдался для штамма *Acinetobacter junii* K2/6/1, *Acinetobacter venetianus* K2 5/2м, *Rhodococcus ruber* R4/3 (48,2, 47,3 и 47,7%, соответственно).

Таблица 2 – Идентификация штаммов по Малди-Тоф-МС

№ п/п	Номер штамма	Род, вид выделенного штамма
1	2(1)	<i>Staphylococcus piscifermentas</i>
2	4/5(1)	<i>Dietziamaris</i>
3	4/8(4)	<i>Bacillus sp.</i>
4	K2/6/1	<i>Acinetobacterjunii</i>
5	K2 5/2м	<i>Acinetobacter venetianus</i>
6	K2/н	<i>Acinetobacterjunii</i>
7	K2x2	<i>Marganellamorganii</i>
8	R4/1	<i>Lactobacillus curvatus</i>
9	R4/3	<i>Rhodococcusruber</i>
10	4/12	<i>Dietzianatronolimnaea</i>
11	К-2 хи2	<i>Lactobacillus ingluviei</i>
12	K2з	<i>Lactobacillus paracasei</i>
13	Кс 2/4/2	<i>Pseudomonasaeruginosa</i>
14	Кс 2/5/1м	<i>Pseudomonasmendocina</i>
15	4/9(5)	<i>Candida lambica</i>

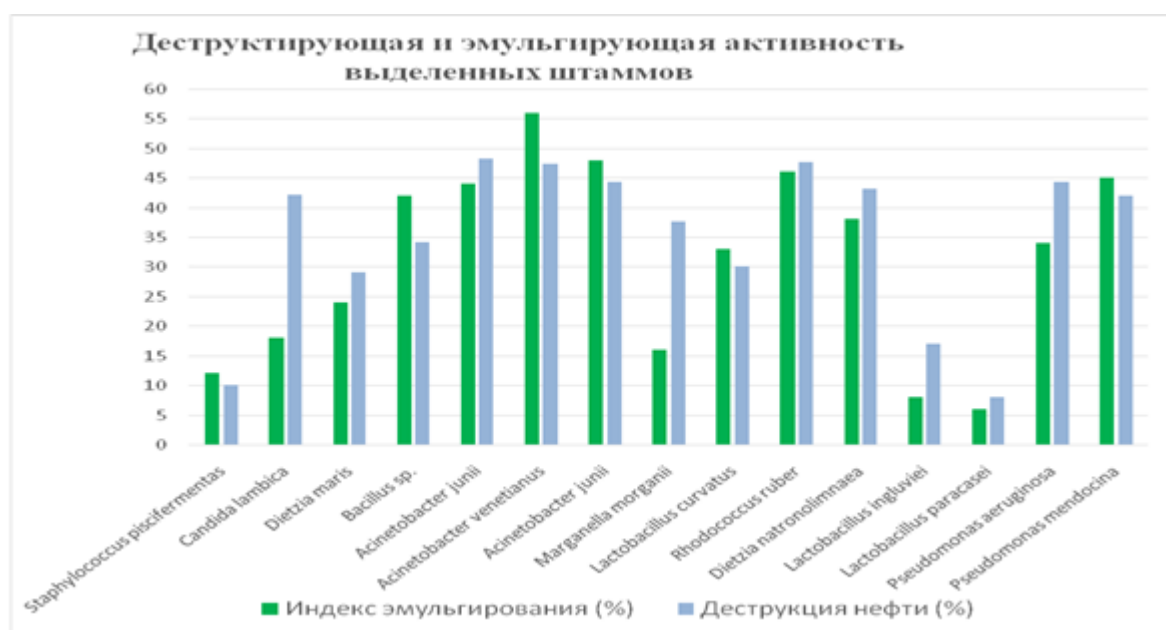


Рисунок – Деструктирующая и эмульгирующая активность выделенных штаммов

Как известно, таксономический состав бактерий нефтедеструкторов в почвенной и водной экосистемах разнообразен. Так, Т.В. Коронелли указывает, что для загрязнённых экосистем характерно доминирование бактерий рода *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* и *Artrobacter* [8].

Закключение. Таким образом, в результате скрининга 15 штаммов-деструкторов углеводов нефти на основании детального анализа их свойств отобрано 2 наиболее эффективных штамма, способных к деструкции нефти и синтезирующие биосурфактанты. Штаммы принадлежат к родам *Rhodococcus*, *Acinetobacter*.

Библиографические ссылки

1. Делеган, Я.А., Ветрова, А.А., Титок, М.А., Филонов, А.Е. Разработка консорциума термотолерантных бактерий как основы биопрепарата для ремедиации нефтезагрязненных грунтов и вод в жарком климате // Биотехнология. – Т.32. – №1. – С. 53-64.
2. Ivanova, AA, Vetrova, AA, Filonov, AE, Boronin, AM. Oil biodegradation by microbial-plant associations. PriklBiokhimMikrobiol. 2015 Mar-Apr; 51(2):191-7. Russian. DOI: 10.7868/s0555109915020063. PMID: 26027354.
3. Ron, E.Z., Rosenberg, E.// Curr. Opin. Biotechnol.2014. V. 27. P. 191-194.
4. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
5. Cooper, D.G., Goldenberg, B.G. Surface-active agents from two Bacillus species // App Environ Microbiol. 1987. – V. 53. – № 2. – P. 224-233.
6. Пархоменко, А.Н. Скрининг микроорганизмов-деструкторов нефтяных углеводородов // Экобиотех, 2019, – Том 2. – № 3. – С. 330-338.
7. Stacey, G.N., Day, J.G. Long-term ex situ conservation of biological resources and the role of biological resourcecenters: Cryopreservation and freeze-drying protocols. — 2nd ed. [Eds. G.N. Stacey, J.G. Day]. – Totowa, NJ: Humana Press,2007. – P. 1-14.
8. Коронелли, Т.В. Поступление углеводов в клетки микроорганизмов // Успехи микробиол. – 1996. – Вып. 6. – С. 579-585.