



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



СКРИНИНГ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ НЕФТЯНЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ

Пархоменко А.Н.

Астраханский государственный технический университет,
Астрахань; E-mail: parhoman@mail.ru

Из нефтезагрязненных почв территории Астраханского газоперерабатывающего завода выделено 34 изолята углеводородокисляющих микроорганизмов. Проведен скрининг микроорганизмов-нефтедеструкторов по способности эмульгировать нефть и нефтепродукты, продуцировать экзополисахариды и проявлять гидрофобность к углеводородам нефти. Показано, что 18 изолятов проявили высокую эмульгирующую активность в отношении нефти, керосина и моторного масла. Также отобрано 10 изолятов с высокими показателями гидрофобности клеток (более 20 %) и 9 изолятов - продуцентов гексозанов. Данные изоляты также являются аборигенными представителями микробиоты данного региона и могут быть использованы для создания и дальнейшего применения биопрепаратов для биоремедиации почвенных территорий от нефтяных загрязнений.

Ключевые слова: почва, нефть и нефтепродукты, микроорганизмы-нефтедеструкторы, эмульгирующая активность, гидрофобность, экзополисахариды, биопрепарат

SCREENING OF MICROORGANISMS-DESTRUCTORS HYDROCARBONS OF PETROLEUM

Parkhomenko A.N.

Astrakhan State Technical University, Astrakhan;
E-mail: parhoman@mail.ru

From samples of oil polluted soils of the Astrakhan gas processing plant allocated 27 hydrocarbon isolates of microorganisms. Screening for the ability of microorganisms to the degradation of oil and the ability to emulsify oil and oil products, to produce exopolysaccharides and to be hydrophobic hydrocarbon oil. It is shown that the 18 isolated microorganisms possess high emulsifying activity against oil, kerosene and engine oil. Also selected 10 isolates with high levels of hydrophobicity of the cells (over 20 %) and 9 isolates - producers of hexosans. These isolates are also indigenous microorganisms of the microbiota of the region and can be used to provide a basis for developing biological products to bioremediation of oil polluted sites.

Keywords: soil, oil and petroleum products, microorganisms-destructors of petroleum, emulsifying activity, hydrophobicity, exopolysaccharides, biological product

Поступила в редакцию: 30.08.2019

[DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-3-330-338](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-3-330-338)

ВВЕДЕНИЕ

Проблема загрязнения почвенных территорий нефтяными углеводородами и продуктами их переработки, несомненно, остается одной из самых актуальных экологических проблем, связанных с производственной деятельностью человека. Значительная часть проблем углеводородного загрязнения в Астраханской области связана с деятельностью Астраханского газового комплекса (АГК). В структуре АГК самый крупный объект - газоперерабатывающий завод (ГПЗ), который занимает общую площадь 185 га, сюда относят также объекты добычи, транспортировки и переработки сырья с общей площадью землепользования 3461 га [Осипов и др., 2006].

Вместе с тем, в газовой промышленности не исключено существование аварийных разливов и накопления отходов газового конденсата, а также получаемых из него продуктов, приводящих к значительному загрязнению прилегающих территорий [Башкин и др., 2011].

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 адаптивной способностью. Такие микроорганизмы должны обладать рядом функциональных особенностей, в частности, продуцировать биосурфактанты [Sáenz-Marta et al., 2015] и экзополисахариды [Грек и др., 1996], а их клетки - проявлять большую гидрофобность, чем углеводороды нефти, т.е. большую степень сродства к гидрофобному субстрату [Волченко, 2006; Демаков и др., 2010; Беляков и др., 2014]. Важным критерием скрининга микроорганизмов-деструкторов является также их способность к продуцированию экзополисахаридов. За счет слизиобразования колонии микроорганизмов прочно удерживаются на твёрдой поверхности, способны к агрегации и образованию биоплёнок, защищены от воздействия неблагоприятных факторов и активно участвуют в процессе усвоения углеводородного субстрата [Сопрунова, Нгуен, 2010].

В связи с этим, целью исследования являлось изучение особенностей микроорганизмов-деструкторов нефтяных углеводородов, выделенных из загрязнённых почв АГПЗ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись чистые культуры углеводородокисляющих микроорганизмов, ранее выделенные из почв модельных экспериментальных участков АГПЗ, загрязнённых нефтяными углеводородами.

При проведении экспериментальных исследований использовали стандартные и общепринятые методы исследований [Дегтярева и др., 2017]. Для определения эмульгирующей активности изоляты выращивали в течение 5 суток на скошенной агаризованной среде (МПА с внесением 1 % нефти). Затем клетки смывали питательной средой следующего состава: (г/л): K_2HPO_4 – 7,0; KH_2PO_4 – 3,0; $CaCl_2$ (1 %, мл) – 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; $MnSO_4 \cdot 3H_2O$ – 0,5; H_2SO_4 (0,1н, мл) – 10,0. Полученные суспензии выдерживали в течение суток, после чего центрифугировали при 6000 об/мин в течение 15 мин. Эмульгирующую активность исследуемых культур бактерий и дрожжей определяли путем добавления к 4 мл полученного образца 4 мл бензина, керосина, дизельного топлива, моторного масла или сырой нефти и последующим встряхиванием в течение 10 мин. Эмульсию оставляли на 24 ч при комнатной температуре, затем учитывали соотношение полученной эмульсии к общей высоте жидкости в процентах [Ягофарова и др., 2012].

Способность исследуемых культур окислять парафин определяли по методу Маккланга путем высева культур на поверхность плотной среды следующего состава, г/л: $NaNO_3$ – 2,0; $MnSO_4$ – 0,008; K_2HPO_4 – 1,0; $ZnSO_4$ – 0,002; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; агар – 20; $Fe_2(SO_4)_3$ – 0,01. Углеводородокисляющую активность оценивали по степени выделения продуктов метаболизма (в основном, кислот) при культивировании микроорганизмов на плотной минеральной среде с добавлением нефтепродуктов [Соколова, 2012].

Показатель гидрофобности исследуемых микроорганизмов определяли по методу Розенберга [Rosenberg, 1984] в модификациях Е.В. Серебряковой (2002) и А.Ю. Белякова (2014).

Выделение экзополисахаридов из культуральной жидкости исследуемых микроорганизмов проводили с помощью этанола, их концентрацию в культуральной жидкости определяли фенол-сернокислотным методом [Chi et.al., 2013]. Для этого к 0,5 мл культуральной жидкости добавляли 96 % этанол для осаждения полисахаридов. Через 24 часа полученный раствор центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин. Осадок трижды промывали этанолом при центрифугировании (10 мин при 8000 об/мин) и растворяли в дистиллированной воде. К 0,5 мл исследуемого раствора добавляли 0,5 мл фенола и 2,5 мл конц. H_2SO_4 . Концентрацию экзополисахаридов определяли фотоэлектроколориметрически при $D = 490$ нм (для гексозанов) и при $D = 480$ нм (для пентозанов).

Также определяли количество клеток микроорганизмов в культуральной жидкости методом Виноградского-Брида [Дегтярева и др., 2017].

Полученные данные подвергались статистической обработке с помощью программы Microsoft Excel for Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе исследований из 30 изолятов углеводородокисляющих микроорганизмов отобрано 20, проявивших различную степень эмульгирующей активности в отношении сырой нефти – от 10 до 95 % (рис. 1). В дальнейшем, используя эти изоляты, также определили индекс эмульгирования других гидрофобных субстратов (бензина, керосина, дизельного топлива, моторного масла). Полученные данные также выражали в процентах (рис. 2).

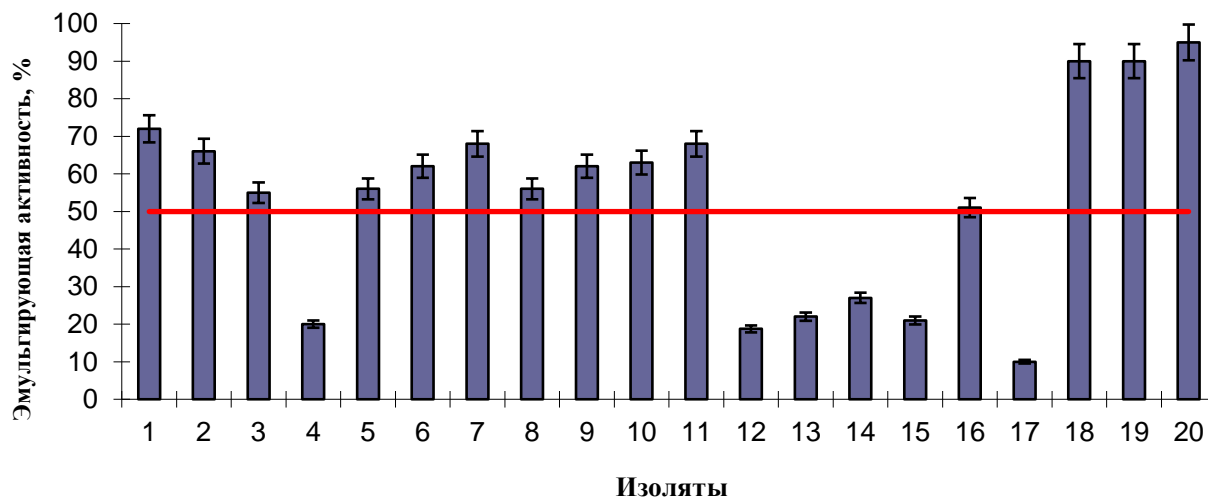


Рис. 1. Эмульгирующая активность исследуемых штаммов по отношению к сырой нефти

Минимальная эмульгирующая активность наблюдалась в отношении бензина и дизельного топлива - индекс эмульгирования не превышал 0,43 и 6,6 % соответственно. Высокую активность в отношении керосина проявили 8 изолятов, индекс эмульгирования которых составил 50-68 % (рис. 2). Высокая активность отмечена у 18 из 20 изолятов в отношении моторного масла (рис. 2) и составила 74,5-92 %.

По мнению некоторых авторов [Бектурова и др., 2013], изоляты с индексом эмульгирования более 50 %, считаются перспективными продуцентами поверхностно-активных веществ. Следовательно, активными продуцентами биосурфактантов являются 19 исследуемых изолятов, причем изоляты № 1-3, 7, 18-19, являются наиболее значимыми, так как проявили высокую активность не только в отношении нефти, но и керосина и моторного масла.

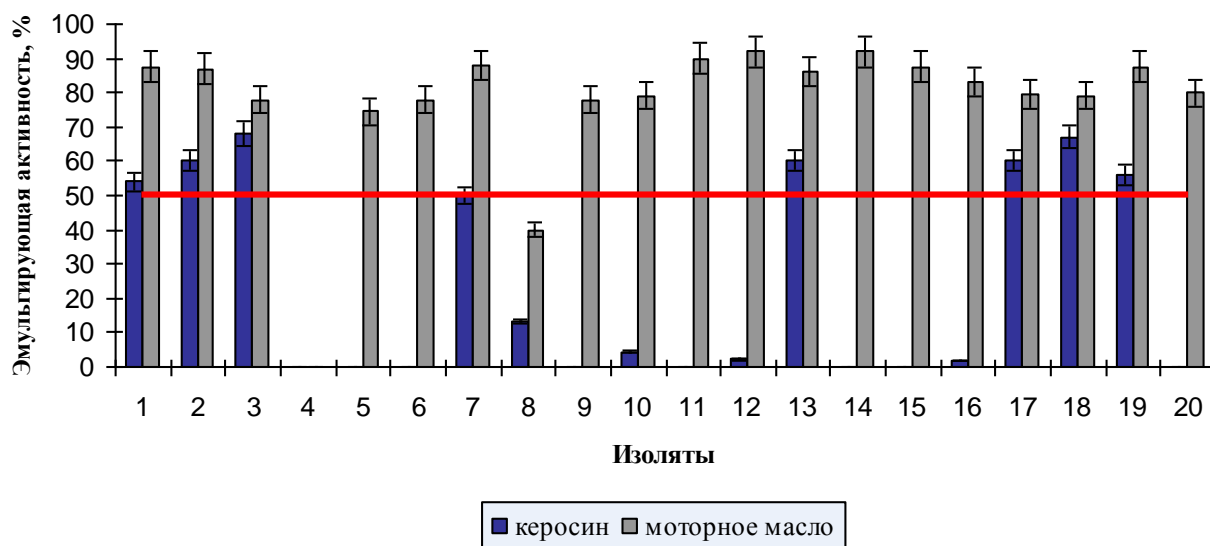


Рис. 2. Эмульгирующая активность исследуемых штаммов по отношению к керосину и моторному маслу

Способность изолятов мицелиальных и дрожжеподобных грибов к деструкции углеводородов оценивали при культивировании на средах с внесением 1 % нефти, бензина, керосина, дизельного топлива, моторного масла в качестве единственного источника углерода. Через 7 суток культивирования посеvy обрабатывали бромтимоловым синим, по характеру изменения окраски среды от бирюзово-синего до жёлтого судили о способности изолятов разлагать различные субстраты с образованием продуктов метаболизма, например, кислот. Полученные результаты сравнивали с контрольными высевками на среды без добавления углеводородов, также обработанные индикатором (рис. 3).

В результате установлено, что изолят 23 (*Aspergillus sp.*) способен к окислению всех представленных нефтепродуктов, причем наиболее активно в отношении нефти, дизельного топлива, керосина (рис. 3). Для остальных изолятов характерен слабый рост на среде с добавлением дизельного топлива, керосина, бензина, и умеренный рост при внесении моторного масла; при обработке индикатором пожелтение среды наблюдали при культивировании изолятов 23 и 24, что свидетельствует об активном процессе кислотообразования данных культур. Также отмечено, что данные изоляты, по сравнению с бактериями и дрожжами, способны к более активному усвоению парафинов.

Важным критерием отбора активных штаммов–продуцентов биосурфактантов является гидрофобность их клеток. Определение показателя гидрофобности (ПГ) клеточной поверхности исследуемых изолятов проводили поэтапно: на первом этапе, используя метод Розенберга в модификации А.Ю. Белякова, определили ПГ для 19 изолятов, являющихся

активными продуцентами биосурфактантов, затем провели повторное определение этого показателя по Е.В. Серебряковой. Полученные значения выражали в %.

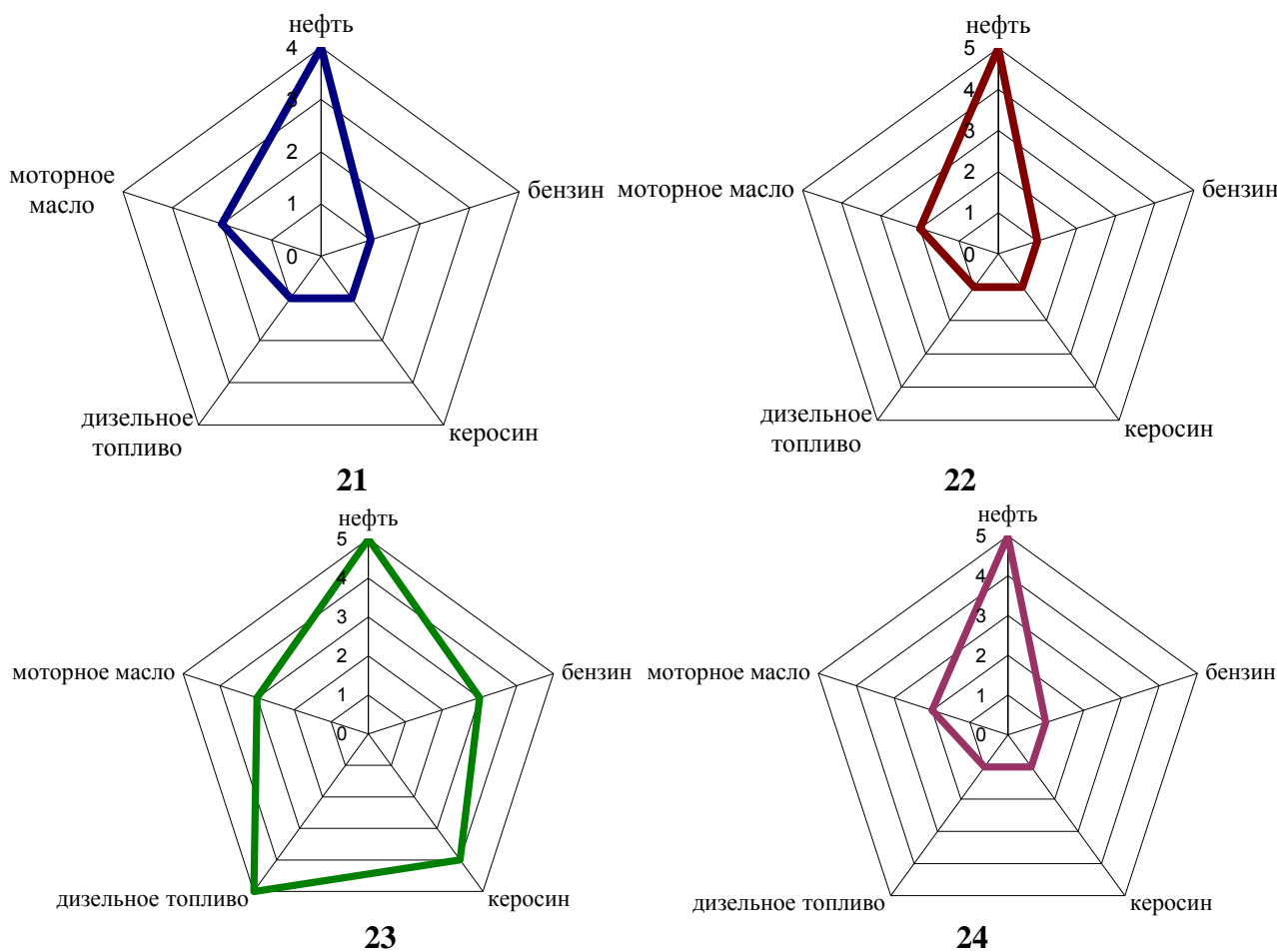


Рис. 3. Углеводородокисляющая активность исследуемых изолятов

Результаты показали, что величины гидрофобности значительно различаются в зависимости от используемой модификации метода, что связано с различием в объеме используемого хлороформа и времени реагирования клеточной суспензии с растворителем. Полученные сравнительные данные представлены на рисунке 4.

По литературным данным [Волченко, 2006], высоким следует считать ПГ более 20 %. Также отмечено, что увеличение гидрофобности суспендированных клеток способствует снижению уровня поверхностного натяжения и увеличению эмульгирующей активности микроорганизмов.

Компоненты нефти по своей природе практически нерастворимы в воде, поэтому образование микроорганизмами биосурфактантов (биоПАВ) является одним из этапов биодegradации нефти. Они способствуют солубилизации углеводородов, образуя мелкодисперсную эмульсию, в результате чего микробные клетки контактируют с гидрофобным субстратом [Льонг, 2014], а также диспергируют углеводороды, облегчая их биодоступность для других микроорганизмов-нефтедеструкторов.

Результаты, полученные с использованием модификации метода А.Ю. Белякова (рис. 4а) свидетельствуют, что высокой гидрофобностью обладают клетки 14 изолятов (от 30 до 97 %), а по модификации Е.В. Серебряковой (рис. 4б) – 12 изолятов (от 25 до 96,7 %). Для остальных изолятов получены отрицательные значения ПГ, что может свидетельствовать об

особом характере взаимодействия клеток этих микроорганизмов с гидрофобным субстратом, в результате чего их клетки не могут переходить в фазу хлороформа.

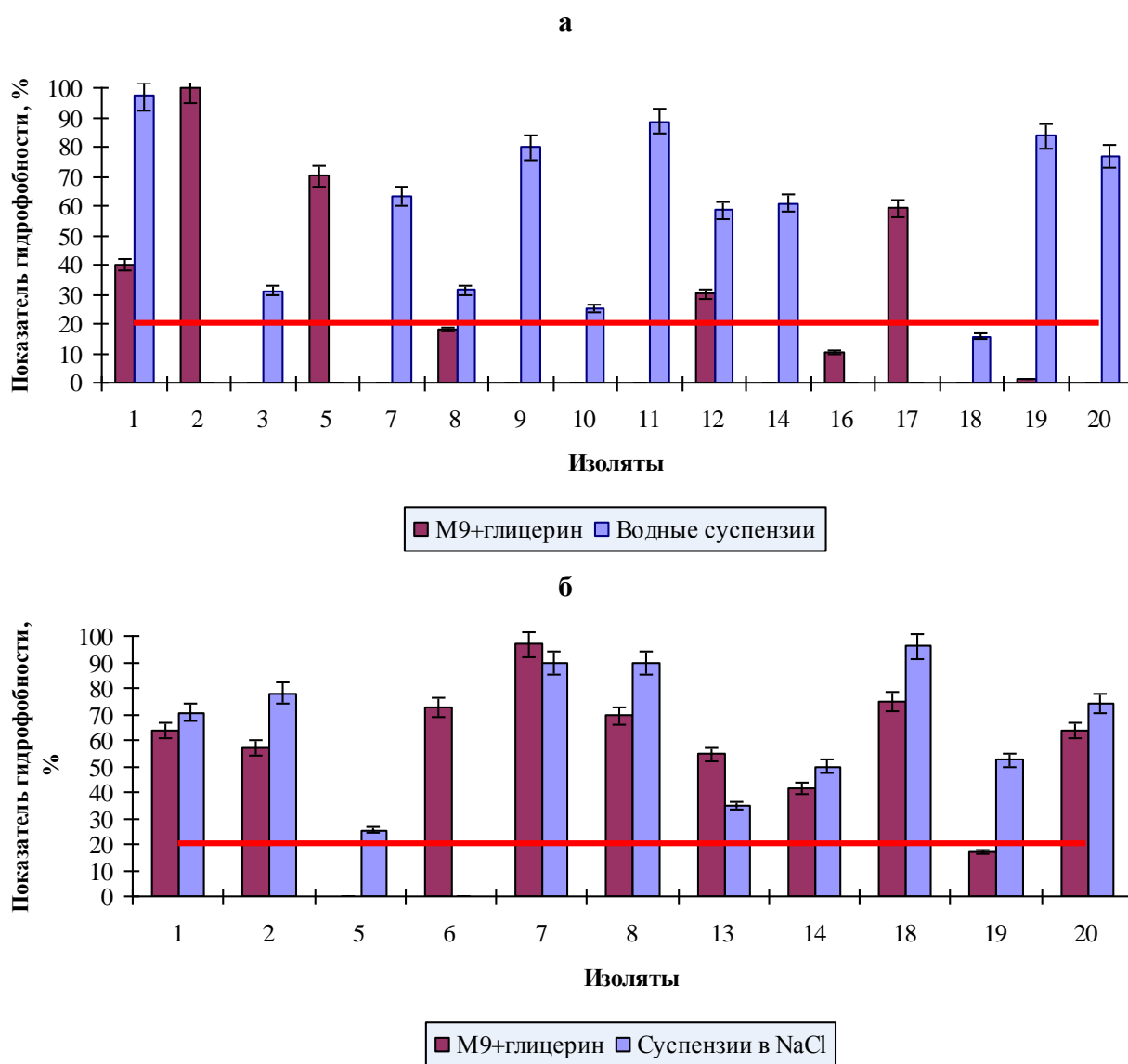


Рис. 4. Показатель гидрофобности исследуемых изолятов по методу Розенберга: а – модификация А.Ю. Белякова; б – модификация Е.В. Серебряковой

Отмечено, что для штаммов № 1, 2, 5-7, 9, 11, 18-20, показавших наиболее высокие значения ПГ, характерна также высокая эмульгирующая активность (коэффициент корреляции $r = 0,67$), что характеризует их как перспективных штаммов-деструкторов, продуцирующих микробные биоПАВы.

В этой связи целесообразным является также определение способности исследуемых штаммов продуцировать экзополисахариды (ЭПС). Для выявления способности к продуцированию ЭПС изоляты культивировали в течение 6 суток при 30 °С на жидкой минеральной среде М9 с добавлением 1,2 % глицерина или сахарозы. Затем определяли концентрацию ЭПС в культуральной жидкости.

Полученные результаты свидетельствуют, что в культуральной жидкости исследуемых микроорганизмов преобладают гексозаны (рис. 5).

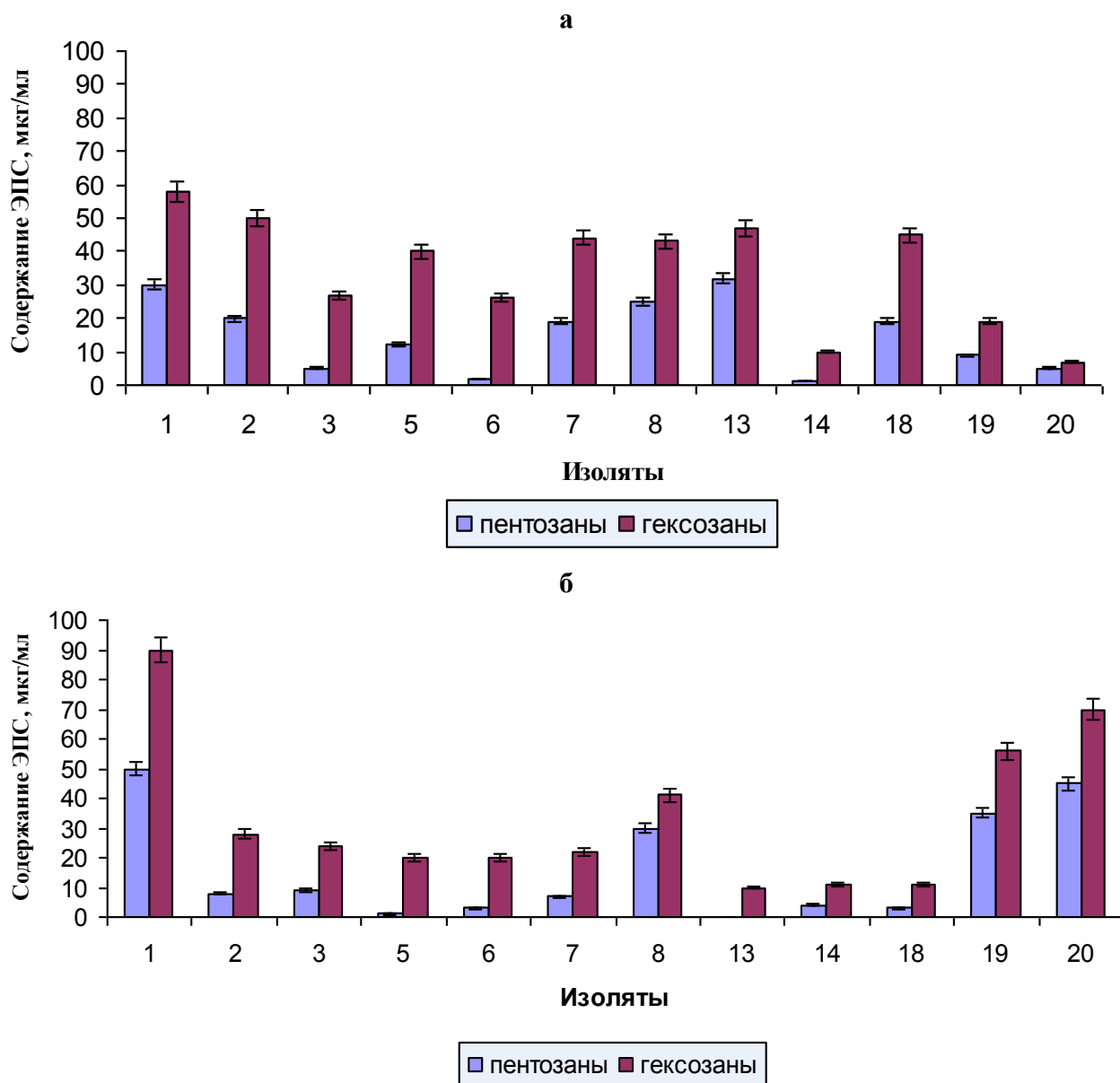


Рис. 5. Содержание ЭПС в культуральной жидкости исследуемых микроорганизмов: а – на среде с глицерином; б – на среде с сахарозой

В целом, большее количество ЭПС обнаружено в культуральной жидкости изолятов № 1, 2, 5, 7, 8, 13, 18-20 (рис. 5). При этом, изоляты № 2, 5, 7, 13, 18 активнее образуют ЭПС на среде с глицерином, а изоляты №1, 19 и 20 – на среде с сахарозой. В то же время обнаружена положительная корреляционная зависимость между численностью клеток при культивировании на среде - с глицерином и продукцией гексозанов ($r = 0,73$), а на среде с сахарозой - тесные отрицательные корреляции между числом клеток и продукцией пентозанов и гексозанов ($r = -0,98$ и $r = -0,89$ соответственно).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что многие микроорганизмы-деструкторы проявляют высокую эмульгирующую активность в отношении нефти, керосина и моторного масла. Наиболее активными деструкторами нефтепродуктов являются 8 изолятов (7 бактериальных и 1 мицелиальный), активных не только в отношении нефти, но и других нефтепродуктов. Для 10 исследуемых изолятов, наряду с высокими показателями гидрофобности клеток, показана положительная корреляционная зависимость между этим показателем и эмульгирующей активностью, что характеризует их как перспективных штаммов-деструкторов, продуцирующих микробные биоПАВы. Проведенные исследования позволили также выявить 9 изолятов - продуцентов ЭПС, преимущественно гексозанов.

Данные изоляты не только обладают высокой деструкционной активностью в отношении различных нефтяных углеводородов, являются аборигенными представителями микробиоты данного региона, но и обладают комплексом промышленно значимых свойств, а, следовательно, могут быть рассмотрены в качестве основы для создания биопрепарата, предназначенного для биоремедиации нефтезагрязненных почвенных территорий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Башкин В.Н., Галиулин Р.В., Галиулина Р.А., Шурупова Е.С. Решение проблемы аварийных разливов и накопления отходов газового конденсата и метанола // Трубопроводный транспорт [теория и практика]. 2011. №4 (26). С. 48-53.
2. Бектурова А.Ж., Масалимов Ж.К., Мархаметова Ж.Ж., Еркасов Р.Ш. Эмульгирующая активность некоторых углеводородокисляющих микроорганизмов // Вестник КазНУ. Серия биологическая. 2013. № 3/1 (59). С. 56-58.
3. Беляков А.Ю., Плешакова Е.В., Амангалиева В.А. Эколого-функциональные особенности бактерий, выделенных из буровых шламов // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2014. № 1. Т. 16. С. 294-298.
4. Волченко Н.Н. Влияние условий культивирования на поверхностно-активные свойства углеводородокисляющих актинобактерий: Дис. ... канд. биол. наук. Ставрополь, 2006. 215 с.
5. Грек О.В., Зольникова Н.В., Яковлев В.И. Образование вторичных метаболитов микроорганизмами-нефтедеструкторами на сырой нефти и нефтепродуктах // Актуал. пробл. создания нов. лекарств. средств: Всерос. науч. конф. СПб, 1996. С. 13.
6. Дегтярева И.А., Вахитова Э.Т., Яппаров И.А., Давлетшина А.Я. Методы биологической диагностики почв // Вестник технологического университета. 2017. Т.20. №24. С. 163-168.
7. Демаков В.А., Кузнецова М.В., Карпунина Т.И., Николаева Н.В. Гидрофобные свойства и пленкообразующая способность штаммов рода *Pseudomonas*, изолированных из разных экологических ниш // Вестник Пермского университета. Серия Биология. 2010. Вып. 1(1). С. 55-58.

8. Лыонг М.Т., Нечаева И.А., Понаморева О.Н. Изучение эмульгирующих свойств бактерий-деструкторов углеводородов нефти // Актуальная биотехнология. 2014. №3 (10). С. 108-109.
9. Осипов Б.Е., Саушин А.З., Сокирко Г.И., Тягненко В.А. Моделирование аварийных выбросов и разливов нефте-, газо-, серосодержащих соединений в объекты окружающей среды. Астрахань: ИПЦ Факел ООО «Астраханьгазпром», 2006. 174 с.
10. Серебрякова Е.В., Дармов И.В., Медведев Н.П., Алексеев С.А., Рыбак С.И. Оценка гидрофобных свойств бактериальных клеток по адсорбции на поверхности капель хлороформа // Микробиология. 2002. Т. 71. № 2. С. 237-239.
11. Соколова В.В. Углеводородокисляющие бактерии и ассимиляционный потенциал морской воды Северного Каспия: Дис. ... канд. биол. наук. Астрахань, 2012. 159 с.
12. Сопрунова О.Б., Нгуен Виет Тьен. Перспективы использования слизеобразующих бактерий в нефтяной отрасли // Юг России: экология, развитие. 2010. Т.5. № 4. С. 91-93.
13. Ягофарова А.Я., Молдагулова Н.Б., Муканова К.Т., Канаев Д.Б., Курманбаева А.Б., Хасенова Э.Ж. Выделение биосурфактантов из супернатанта штаммов микроорганизмов *Bacillus thuringiensis A1*, *Dietzia maris U.2.5* // Биотехнология. Теория и практика. 2012. № 4. С. 30-33.
14. Chi C., Chang H., Li Z., Jameel H., Zhang Z. A method for rapid determination of sugars in lignocellulose prehydrolyzate // BioResources. 2013. V. 8(1). P. 172-181.
15. Rosenberg M. Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity // FEMS Microbiology. 1984. V. 22. P. 289-295.
16. Sáenz-Marta C.I., Lourdes Ballinas-Casarrubias M., Rivera-Chavira B. Biosurfactants as Useful Tools in Bioremediation // World's Largest Science, Technology & Medicine Open Access book publisher. 2015. V. 5. P. 93-104.