

**С.А. Айткельдиева*, Э.Р. Файзулина, О.Н. Ауэзова,
Г.А. Спанкулова, Л.Г. Татаркина, А.В. Алимбетова**

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»,
Казахстан, г. Алматы, e-mail: sa.kz@list.ru, ecomicrolab@gmail.com

ОЦЕНКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ДЕГРАДАЦИИ НЕФТИ

Проблема загрязнения природных экосистем нефтью и нефтепродуктами стоит крайне остро во многих странах мира, в том числе и в Казахстане. Значительная часть нефтезагрязненных участков расположена в регионах с жарким климатом, и в таких странах проводятся исследования по выделению термотолерантных микроорганизмов-деструкторов нефти с целью дальнейшего их применения для ремедиации нефтезагрязненных территорий. Круг таких микроорганизмов достаточно широк и разнообразен.

Эффективность применения способа биоремедиации загрязненных нефтью экосистем во многом зависит от биотических и абиотических факторов, например, таких как соленость, температурный режим, способность к продуцированию ПАВ, pH и т.д. Ранее из почв Западного Казахстана нами были выделены и идентифицированы термотолерантные нефтеокисляющие микроорганизмы, способные окислять углеводороды нефти в широком диапазоне температур. Целью данной работы было изучение способности активных термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов к деградации нефти при разных концентрациях минеральных солей (Cl^- , SO_4^{2-}) и определение эмульгирующей активности для оценки их биотехнологического потенциала.

Установлено, что все отобранные штаммы являются галотолерантными. При этом на степень деструкции нефти в присутствии минеральных солей влиял температурный фактор. Самый высокий процент деградации нефти был при 35 °С. При этой температуре высокую активность показали штаммы К-3, 4/5, П1-35-14 при всех исследуемых концентрациях NaCl (3, 5 и 10%) – 73,6-85,9%, 62,7-91,1% и 73,6-75,7% соответственно. При 40 °С наибольшую активность показал штамм ИП-40-4 – 41,4-51,2%. При 50 °С деструкционная способность исследуемых культур была примерно на одном уровне при всех концентрациях NaCl. Культивирование отобранных штаммов с повышенным содержанием в среде $MgSO_4$ показало, что наиболее устойчивым был штамм К-3, который сохранял высокую активность при всех температурах.

Было показано, что активные штаммы термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов обладают эмульгирующей активностью. Высокие значения эмульгирующей активности отмечаются при температуре 35 °С, а при последующем повышении температуры образование ПАВ снижалось. При 35 °С наибольшей эмульгирующей активностью обладал штамм П2-35-9, при 40 °С и 50 °С – штамм К-3.

Ключевые слова: биоремедиация, термотолерантные углеводородокисляющие бактерии, засоленность, галотолерантность, эмульгирующая активность.

S.A. Aitkeldiyeva, E.R. Faizulina, O.N. Auezova,
G.A. Spankulova, L.G. Tatarkina, A.V. Alimbetova
LLC "Research and Production Center for Microbiology and Virology",
Kazakhstan, Almaty, e-mail: sa.kz@list.ru, ecomicrolab@gmail.com

Evaluation of biotechnological potential of thermotolerant microorganisms for oil degradation

The problem of pollution of natural ecosystems with oil and oil products is extremely acute in many countries of the world, including Kazakhstan. A significant part of oil-contaminated sites is located in regions with a hot climate, and in such countries studies are underway to isolate thermotolerant oil-degrading microorganisms with a view to their further use for remediation of oil-contaminated territories. The circle of such microorganisms is quite wide and diverse.

The effectiveness of the method of bioremediation of oil-polluted ecosystems largely depends on biotic and abiotic factors, for example, salinity, temperature, ability to produce surfactants, pH, etc. Earlier from the soils of Western Kazakhstan, we isolated and identified thermotolerant oil-oxidizing

microorganisms capable of oxidizing oil hydrocarbons in a wide temperature range. The aim of this work was to study the ability of active thermotolerant oil-oxidizing microorganisms to degrade oil at different concentrations of mineral salts (Cl^- , SO_4^{2-}) and to determine the emulsifying activity to assess their biotechnological potential.

It was established that all selected strains are halotolerant. Moreover, the temperature factor influenced the degree of oil degradation in the presence of mineral salts. The highest percentage of oil degradation was at 35°C. At this temperature, strains K-3, 4/5, P1-35-14 showed high activity at all studied NaCl concentrations (3, 5 and 10%) – 73.6-85.9%, 62.7-91.1 % and 73.6-75.7%, respectively. At 40°C, the strain IP-40-4 showed the highest activity – 41.4-51.2%. At 50°C, the destruction ability of the studied cultures was approximately at the same level at all NaCl concentrations. The cultivation of selected strains with a high content of MgSO_4 in the medium showed that the K-3 strain was the most stable, which remained highly active at all temperatures.

It was shown that active strains of thermotolerant oil-oxidizing microorganisms had emulsifying activity. High values of emulsifying activity are observed at a temperature of 35°C, and with a subsequent increase in temperature, the formation of surfactants decreased. At 35°C, strain P2-35-9 had the greatest emulsifying activity, and at 40°C and 50°C – strain K-3.

Key words: bioremediation, thermotolerant hydrocarbon-oxidizing bacteria, salinity, halotolerance, emulsifying activity.

С.А. Айткельдиева*, Э.Р. Файзулина, О.Н. Ауэзова,
Г.А. Спанкулова, Л.Г. Татаркина, А.В. Алимбетова

«Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы» ЖШС,
Қазақстан, Алматы қ., e-mail: sa.kz@list.ru, ecomicrolab@gmail.com

Мұнайды ыдырату үшін термотолерантты микроорганизмдердің биотехнологиялық мүмкіндігін бағалау

Табиғи экожүйелердің мұнай және мұнай өнімдерімен ластануы әлемнің көптеген елдерінде, оның ішінде Қазақстанда өте өткір мәселе болып табылады. Мұнаймен ластанған жерлердің едәуір бөлігі ыстық климаты бар аймақтарда орналасқан және мұндай елдерде мұнайды ыдырататын термотолерантты микроағзаларды бөліп алып, оларды одан әрі мұнаймен ластанған аумақтарды қалпына келтіру үшін пайдалану мақсатында зерттеулер жүргізіледі. Мұндай микроағзалардың шеңбері өте кең және алуан түрлі.

Мұнаймен ластанған экожүйелерді биоремедиациялау әдісінің тиімділігі көбінесе биотикалық және абиотикалық факторларға байланысты, мысалы, тұздылық, температура, ББЗ (беттік-белсенді заттарды) өндіру қабілетіне, рН және т.б. сияқты. Батыс Қазақстан топырағынан біз ертерек кең температуралық диапазонда мұнай көмірсутектерін тотықтыруға қабілетті, термотолерантты мұнай тотықтырғыш микроағзаларды бөліп алып және сәйкестендіргенбіз. Бұл жұмыстың мақсаты белсенді термотолерантты мұнай тотықтырғыш микроағзалардың минералды тұздардың әр түрлі концентрациясында (Cl^- , SO_4^{2-}) мұнайды ыдыратуға қабілеттілігін зерттеу және олардың биотехнологиялық мүмкіндігін бағалау үшін эмульгаторлық белсенділікті анықтау болды.

Барлық таңдалған штамдар галотолерантты екені анықталды. Сонымен қатар, минералды тұздардың қатысуымен мұнайдың ыдырау деңгейіне температура факторы әсер етті. Мұнайдың ең жоғары ыдырау пайызы 35°C болды. Бұл температурада K-3, 4/5, П1-35-14 штамдары зерттелген барлық NaCl концентрациясында (3, 5 және 10%) жоғары белсенділік көрсетті – 73.6-85.9%, 62.7-91.1% сәйкесінше және 73,6-75,7%. 40°C кезінде ең жоғары белсенділік – 41.4-51.2% ИП-40-4 штаммы көрсетті. 50°C температурада зерттелген дақылдардың ыдырату қабілеттілігі барлық NaCl концентрациясында бірдей деңгейде болды. Таңдалған штаммдарды жоғары құрамда MgSO_4 бар қоректік ортада өсіруде K-3 штаммы ең тұрақты екенін көрсетті, сондай-ақ барлық температурада жоғары белсенділігін сақтады.

Термотолерантты мұнай тотықтырғыш микроағзалардың белсенді штамдары эмульгаторлық белсенділікке ие екендігі көрсетілді. Эмульгаторлық белсенділіктің жоғары мәндері 35°C температурада байқалады, ал содан кейін температураның жоғарылауында ББЗ түзілуі төмендеді. 35°C температурада ең үлкен эмульгаторлық белсенділікке П2-35-9 штаммы, ал 40°C және 50°C K-3 штаммы ие болды.

Түйін сөздер: биоремедиация, термотолерантты көмірсутек тотықтырғыш бактериялар, тұздылық, галотолерантты, эмульгаторлық белсенділік.

Введение

Загрязнение окружающей среды нефтяными углеводородами стало одной из самых серьезных глобальных проблем из-за его токсичности для всех низших и высших форм жизни, включая людей [1, 2, 3]. Восстановление загрязненных участков путем биодegradации с использованием нефтеокисляющих микроорганизмов является наиболее эффективным способом, так как обычные физико-химические методы восстановления являются технически, а также экономически сложными. В связи с тем, что значительная часть нефтезагрязненных участков расположена на территориях с повышенной климатической температурой, проводятся многочисленные исследования по выявлению и изучению термотолерантных микроорганизмов-деструкторов нефти с целью дальнейшего их применения для ремедиации нефтезагрязненных территорий. Такого рода исследования на сегодняшний день являются актуальными [4].

Современные технологии биоремедиации нефтезагрязненных экосистем основаны, главным образом, на применении бактериальных препаратов, эффективность применения которых определяется специфическими свойствами штамма-деструктора и жизнеспособностью клеток, входящих в его состав.

Так, на активность микроорганизмов влияют многие факторы, одним из которых является соленость [5]. Qin X. и соавт. [6] предположили, что соленость оказывает значительное влияние на процесс биоремедиации и биоразложения нефти, а также на рост микроорганизмов. Было доказано, что соленость оказывает неблагоприятное влияние на активность некоторых ключевых ферментов, участвующих в процессе биодegradации углеводов [7]. В то же время было показано, что ряд органических загрязнителей минерализуется или трансформируется микроорганизмами, способными расти в присутствии соли [8]. Так, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* способен расти в условиях солености до 20% и утилизировать различные алифатические и ароматические углеводороды [9]. Mnif S. с соавт. [10] выделили из нефтяного месторождения в Тунисе штамм C2SS100, принадлежащий к роду *Halomonas*. Штамм рос при температуре 37 °С и солености 10 г/л и был способен окислять углеводороды, в частности, гексадекан. Из нефтяной скважины в Тунисе был выделен штамм Lit2, принадлежащий к роду *Modicisalibacter*, способный к росту в температурном диапазоне 15-45 °С и выдержи-

вающий до 25% соли в среде [11]. Wang Y.N. с соавт. [12] выделили из месторождения в Китае новый штамм *Amicollicoccus subflavus* DQS3-9A1, растущий в диапазоне температур 15-42 °С с оптимумом 37 °С, рН 6-11 (оптимум 8) и в присутствии соли в среде 1-12% (оптимум 8%).

Одной из наиболее важных особенностей бактерий, разлагающих углеводороды нефти, является способность продуцировать биосурфактанты, включающие различные химические структуры, такие как жирные кислоты, гликолипиды, пептиды и белки с гидрофобными и гидрофильными фрагментами, которые уменьшают поверхностное и межфазное натяжение между отдельными молекулами [13]. Добавление поверхностно-активных веществ повышает растворимость, десорбцию и биодоступность нефти. Поэтому существует необходимость в поиске микроорганизмов – деструкторов нефти и продуцентов поверхностно активных веществ, изменяющих свойства нефтяных пленок. Способность к образованию биосурфактантов выявлена у широкого круга микроорганизмов. Так, например, микробное сообщество нефтяного пласта включало аэробные углеводородокисляющие бактерии и анаэробные бродильные, сульфатредуцирующие и метанобразующие микроорганизмы. Был выявлен ряд видов микроорганизмов, продуцирующих биосурфактанты, химическая структура которых широко варьировалась. Эти поверхностно-активные вещества включали рамнолипиды, продуцируемые *Pseudomonas sp.*; софоролипиды, производимые *Candida sp.*; сурфактины из *Bacillus subtilis*; липополисахариды, производимые *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1; трегалозные липиды (трегалоллипиды), продуцируемые *Mycobacterium sp.* и *Rhodococcus erythropolis* и фосфолипиды, продуцируемые *Thiobacillus thiooxidans* [14, 15, 16, 17, 18]. Первичную оценку способности к синтезу поверхностно-активных веществ у исследуемых штаммов оценивают по эмульгирующей активности (ЭА) культуральной жидкости, так как известно, что ЭА культуральной жидкости является важной, характеристикой штаммов как продуцентов ПАВ.

Таким образом, для разработки критериев составления микробных консорциумов и создания на их основе бактериальной ассоциации, для биоремедиации территорий, загрязненных высокими концентрациями нефти и нефтепродуктов в широком температурном диапазоне необходимо всестороннее изучение выделенных штаммов. Так в данной работе для исследуемых микроор-

организмов был в первую очередь определён температурный диапазон, при котором происходила деградация углеводов нефти, отношение к высоким концентрациям солей и способность продуцировать биосурфактанты. Ранее нами были выделены 15 наиболее активных культур нефтеокисляющих термотолерантных микроорганизмов, которые могли расти в широком температурном диапазоне [19]. Было установлено, что большинство из них (9 культур) относятся к роду *Bacillus*, 3 культуры являются представителями рода *Brevibacillus*, 3 культуры отнесены к родам *Gordonia*, *Pseudomonas* и *Achromobacter*. Дальнейшая работа проводилась с этими штаммами культур микроорганизмов.

Целью нашего исследования было изучение способности отобранных ранее штаммов термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов окислять углеводороды нефти при различных концентрациях минеральных солей и определение их эмульгирующей активности.

Материалы и методы

Изучение способности штаммов термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов окислять углеводороды нефти при различных концентрациях минеральных солей (Cl^- , SO_4^{2-}) проводили в колбах Эрленмейера с минеральной средой, следующего состава, г/л: NH_4NO_3 – 1,0, K_2HPO_4 – 1,0, KH_2PO_4 – 1,0, MgSO_4 – 0,2, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,02, FeCl_3 – следы, $\text{pH} = 7,0-7,2$. NaCl добавляли в количестве 3, 5 и 10%, MgSO_4 – 0,5 и 1%. В колбы со 100 мл среды вносили по 5 мл суспензии клеток каждой исследуемой культуры и добавляли по 1% (по объему) нефти. Суспензию клеток получали путем смыва стерильной водой биомассы со скошенного питательного агара. Колбы помещали в термостатируемые шейкеры при 35, 40 и 50 °С на 14 суток.

Эмульгирующую активность термотолерантных штаммов исследовали при температурах 35

°С, 40 °С и 50 °С. Изучаемые микроорганизмы выращивали в жидкой минеральной среде с добавлением 1% вазелинового масла в течение 48 ч. Затем эмульсию центрифугировали на центрифуге 5804 R (Eppendorf, Germany) в течение 3 мин при 10000 об/мин. После этого 1 мл супернатанта переносили в пробирки и добавляли 1 мл минеральной среды и 0,5 мл вазелинового масла. Содержание пробирки перемешивали на миксере в течение 2 мин. Оценку поверхностной активности проводили по оптической плотности на спектрофотометре PD-303 (Japan) при длине волны 540 нм. В качестве контроля использовали 0,5 мл вазелинового масла в 2 мл среды [20]. Количественное потребление нефти определяли гравиметрическим методом [21].

Результаты исследований и обсуждение

Известно, что почва на нефтяных месторождениях Казахстана является в разной степени засоленной. По типу засоления – это, прежде всего, хлоридно-натриевое и сульфатно-магниевое засоление. В связи с этим изучалась способность ранее отобранных термотолерантных нефтеокисляющих бактерий деградировать нефть м. Жанаталап при повышенных температурах и различных концентрациях солей NaCl (3, 5 и 10%) и MgSO_4 (0,5 и 1%).

Изучение количественного потребления нефти при 35 °С показало, что четыре культуры К-3, 4/5, 22ПК, П1-35-14 проявляли высокую активность при всех исследуемых концентрациях NaCl (таблица 1). Наиболее заметное снижение активности с увеличением концентрации соли отмечено у штамма 4/5. У культур К-3 и 22ПК происходило незначительное снижение активности, а у культуры П1-35-14 при всех концентрациях степень деструкции нефти оставалась практически на одном уровне и составляла 73,6-75,7%. Наименьшую активность показали культуры П1-35-2 и П2-35-9.

Таблица 1 – Деструкция нефти активными штаммами термотолерантных бактерий при разных концентрациях NaCl

Штамм	Степень деструкции нефти, %		
	3% NaCl	5% NaCl	10% NaCl
35°С			
<i>Rhodococcus fascians</i> К-3	85,9±2,6	81,3±2,3	73,6±2,1
4/5	91,1±2,3	65,4±2,0	62,7±0,5
<i>Rhodococcus jialingiae</i> 22ПК	70,7±2,1	64,3±2,1	61,6±1,8

Штамм	Степень деструкции нефти, %		
	3% NaCl	5% NaCl	10% NaCl
<i>Bacillus megaterium</i> П1-35-2	31,0±1,6	35,9±1,0	32,5±0,6
<i>Gordonia amicalis</i> П1-35-14	74,9±2,1	75,7±2,2	73,6±2,3
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> П2-35-9	34,9±1,8	45,1±1,6	27,1±0,5
контроль	8,2±0,4	8,9±0,6	9,5±0,6
40°C			
<i>Rhodococcus fascians</i> К-3	39,5±0,9	32,8±1,4	40,6±0,5
<i>Achromobacter pestifer</i> 25Ш	42,6±0,9	43,2±1,8	36,8±0,6
<i>Bacillus cereus</i> ИП-40-4	51,2±1,0	41,4±1,8	47,4±0,9
<i>Bacillus cereus</i> П1-40-8	38,9±1,6	39,0±1,6	39,0±1,4
контроль	9,3±0,6	9,9±0,4	10,4±1,4
50°C			
<i>Rhodococcus fascians</i> К-3	41,1±1,1	39,0±0,6	40,3±0,5
<i>Bacillus subtilis</i> 72	43,3±2,3	38,9±1,2	38,8±0,9
<i>Bacillus aerius</i> KB-36	45,7±1,1	41,2±2,1	38,6±1,1
<i>Brevibacillus borstelensis</i> П2-50-2	36,1±0,9	38,7±1,6	38,6±1,1
<i>Brevibacillus borstelensis</i> П2-50-5	26,3±1,2	51,4±2,6	38,8±0,5
контроль	10,2±0,6	10,4±0,4	10,5±0,4

При температуре инкубации 40 °С исследовались четыре ранее отобранные культуры. Из них наибольшую активность проявил штамм ИП-40-4. Остальные культуры были менее активны. При температуре 50 °С в присутствии в среде 3% NaCl деструкция нефти составляла 26,3-45,7%, при 5% – 38,7-51,4%, при 10% – 38,6-40,3%. У четырех культур К-3, 72, KB-36, П2-50-2 деструкционная способность была примерно на одном уровне при всех концентрациях NaCl. Только у штамма П2-50-5 нефтеокисляющая активность резко возросла при увеличении концентрации соли до 5% и составила 51,4%. При 10%-ном содержании NaCl все исследуемые штаммы утилизировали нефть практически на одном уровне.

Результаты изучения количественного потребления нефти при разных концентрациях MgSO₄ представлены в таблице 2. Показано, что при 35 °С наиболее активным был штамм К-3. При этом концентрация соли практически не влияла на его способность деградировать углеводороды нефти. Также довольно высокий процент утилизации нефти был у культур 4/5, 22ПК и П1-35-14. Однако у штамма 22ПК с увеличением концентрации этой соли происхо-

дило довольно значительное снижение нефтеокисляющей активности. Необходимо отметить, что культура П2-35-9 была более приспособлена к наличию в среде повышенного содержания MgSO₄, чем присутствие NaCl. Так при содержании в среде 10% NaCl деструкция нефти составляла 27,1%, а при содержании 1% MgSO₄ – 42,5%.

Из четырех культур, способных расти на нефти при 40 °С, наибольшая активность отмечена у штамма К-3. Остальные культуры утилизировали нефть примерно на одном уровне. Из пяти культур, способных расти при 50 °С, самым активным был также штамм К-3. При этом с увеличением концентрации сульфата магния возрастала степень утилизации нефти – от 56,1% до 68,9%. Такая же тенденция отмечалась и для штаммов KB-36 и П2-50-2. Штаммы 72 и П2-50-5 утилизировали нефть при обеих концентрациях MgSO₄ на одном уровне.

Таким образом, изучение галотолерантности отобранных штаммов показало, что все они способны расти и утилизировать нефть при повышенном содержании солей NaCl и MgSO₄. При этом на степень деструкции нефти влиял температурный фактор.

Таблица 2 – Деструкция нефти активными штаммами термотолерантных бактерий при разных концентрациях $MgSO_4$

Штамм	Степень деструкции нефти, %	
	0,5% $MgSO_4$	1% $MgSO_4$
35 °C		
<i>Rhodococcus fascians</i> К-3	84,7±2,3	80,5±0,5
<i>Rhodococcus jialingiae</i> 4/5	56,6±1,6	46,2±1,1
<i>Rhodococcus jialingiae</i> 22ПК	62,9±2,1	42,8±0,6
<i>Bacillus megaterium</i> П1-35-2	28,7±0,9	24,9±0,9
<i>Gordonia amicalis</i> П1-35-14	61,6±2,6	54,8±2,3
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> П2-35-9	48,1±1,8	42,5±2,6
контроль	10,8±0,6	10,0±0,4
40 °C		
<i>Rhodococcus fascians</i> К-3	41,6±2,1	41,2±1,3
<i>Achromobacter pestifer</i> 25Ш	36,8±1,1	35,4±0,6
<i>Bacillus cereus</i> ИП-40-4	38,1±1,1	36,0±0,4
<i>Bacillus cereus</i> П1-40-8	37,2±0,8	35,1±1,1
контроль	11,6±0,6	12,6±0,6
50 °C		
<i>Rhodococcus fascians</i> К-3	56,1±2,1	68,9±2,6
<i>Bacillus subtilis</i> 72	47,0±1,8	46,3±0,9
<i>Bacillus aerius</i> КВ-36	43,5±1,1	61,6±2,1
<i>Brevibacillus borstelensis</i> П2-50-2	55,3±2,3	61,6±1,8
<i>Brevibacillus borstelensis</i> П2-50-5	53,7±1,6	52,3±1,1
контроль	11,0±0,4	12,2±0,4

Так как нефть слабо- или не растворима в воде, важным механизмом ее деструкции является образование нефтеокисляющими микроорганизмами поверхностно-активных соединений (биоПАВ или сурфактантов). Поскольку объектами наших исследований были термотолерантные штаммы микроорганизмов, а температура является одним из главных факторов, влияющих на их жизнедеятельность, была проведена сравнительная оценка эмульгирующей активности (ЭА) при температурах 35 °C, 40 °C и 50 °C. По показаниям ЭА каждой изучаемой культуры можно судить о синтезе и освобождении метаболитов с поверхностно-активными свойствами.

Эмульгирующую активность определяли только у штаммов, которые из всех изучаемых

проявляли наибольшую нефтеокисляющую активность при соответствующих температурах (таблица 3). Данные таблицы показали, что наибольшие значения эмульгирующей активности были отмечены при температуре 35 °C. При последующем повышении температуры образование ПАВ снижалось. Относительно контроля высокие значения эмульгирующей активности при 35 °C показали штаммы П2-35-9, П1-35-14 и 22ПК. При 40 °C высокая эмульгирующая активность была у штамма 25Ш, а при 50 °C – у штаммов 72 и П2-50-2. Штамм К-3 был самым активным при температурах 40 °C и 50 °C. У этого штамма при повышении температуры эмульгирующая активность снижалась, но все еще оставалась значительной по отношению к контролю.

Таблица 3 – Значения эмульгирующей активности у отобранных термотолерантных штаммов при разных температурах

Штамм	№ штамма	Оптическая плотность, ед ОП ₅₄₀
35°C		
<i>Rhodococcus jialingiae</i>	4/5	0,093±0,01
<i>Rhodococcus fascians</i>	К-3	0,123±0,03
<i>Rhodococcus jialingiae</i>	22ПК	0,152±0,05
<i>Gordonia amicalis</i>	П1-35-14	0,185±0,05
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	П2-35-9	0,291±0,08
<i>Bacillus megaterium</i>	П1-35-2	0,110±0,04
контроль		0,043±0,01
40°C		
<i>Rhodococcus fascians</i>	К-3	0,120±0,03
<i>Achromobacter pestifer</i>	25Ш	0,108±0,06
<i>Bacillus cereus</i>	ИП-40-4	0,082±0,02
<i>Bacillus cereus</i>	П1-40-8	0,064±0,02
контроль		0,040±0,01
50°C		
<i>Bacillus subtilis</i>	72	0,082±0,02
<i>Rhodococcus fascians</i>	К-3	0,090±0,02
<i>Bacillus aerius</i>	КВ-36	0,064±0,01
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	П2-50-2	0,074±0,02
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	П2-50-5	0,068±0,03
контроль		0,042±0,01

Таким образом, было установлено, что все отобранные активные штаммы термотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов обладают эмульгирующей активностью. При этом у культур одного вида на штаммовом уровне ее значения могли различаться. Эти штаммы являются перспективными для дальнейших исследований по созданию активных консорциумов, используемых для очистки нефтезагрязненных почв в условиях высоких температур. Кроме того, проведенные эксперименты показали, что первичный скрининг активных нефтеокисляющих термотолерантных культур микроорганизмов можно проводить с использованием таких показателей как эмульгирующая активность и отношение к высоким концентрациям солей.

Заключение

Известно, что климат в нефтедобывающих регионах Казахстана резко-континентальный и характеризуется суточными перепадами темпе-

ратур, высокими темпами испарения воды и, как следствие, засоленностью и низкой влажностью грунта. Способность термотолерантных бактерий утилизировать нефть в условиях повышенных температур и содержания соли в среде делает их перспективными агентами ремедиации территорий, которые не могут быть очищены путем применения мезофильных нефтедеструкторов. Физиологические свойства термотолерантных бактерий и их метаболизм адаптированы к повышенным температурам, однако изучение особенностей таких штаммов требует дополнительных исследований. Таксономическое разнообразие термотолерантных бактерий позволяет использовать их в ремедиационных технологиях не только как монокультуры, но и составлять микробные ассоциации с целью ускорения и повышения суммарной эффективности деградационного процесса. Бактериальные сообщества (консорциумы), как правило, более гибкие, чем любые отдельные виды, поэтому они способны окислять более широкий диапазон загрязняющих веществ [22].

Для разработки критериев составления микробных консорциумов и создания на их основе бактериальной ассоциации, для биоремедиации территорий, загрязненных высокими концентрациями нефти и нефтепродуктов в широком температурном диапазоне, было необходимо всестороннее изучение выделенных штаммов. В связи с этим в данной работе для исследуемых микроорганизмов был в первую очередь определен температурный диапазон окисления углеводородов нефти, отношение к высоким концентрациям солей и способность продуцировать биосурфактанты. Известно, что наличие солености ухудшает метаболическую активность многих микробов, тем самым снижая их способность к биоразложению нефти. В частности, соленость отрицательно влияет на активность некоторых ключевых ферментов, участвующих в процессе разложения углеводородов [23]. Так, Ali Ebadi с соавторами [7] показали, что консорциум, состоящий из 4 штаммов *P. aeruginosa*, продуцирующих биосурфактанты, был способен разлагать сырую нефть в присутствии высокой солености. Изучение галотолерантности отобранных нами термотолерантных штаммов показало, что все они способны расти и деградировать нефть при повышенном содержании солей. Было установлено, что с повышением концентрации солей уменьшалась способность нефтеокисляющих штаммов к деградации нефти, что коррелировало с исследованиями, проведенными Qin X. и соавторами [6]. При этом на степень деструкции нефти влиял температурный фактор, как и в случае с вновь выделенным штаммом *Modicisalibacter tunisiensis* LIT2 (T), который рос при температуре от 15 до 45 °C (опт. 37 °C) в присутствии 1-25% NaCl (опт. 10%) NaCl [11]. Галотолерантный бактериальный штамм *Halomonas*

sp. C2SS100 был способен эффективно разлагать углеводороды при 37 °C. Во время роста этого штамма на гексадекане гидрофобность поверхности клеток и эмульгирующая активность увеличивались, что указывало на продукцию биосурфактанта [10]. В целом, результаты исследований, приведенные в данной работе коррелируют с литературными данными. Увеличение концентрации солей и повышение температуры приводят к уменьшению способности штаммов микроорганизмов к окислению углеводородов нефти. Для оценки биотехнологического потенциала выделенных термотолерантных штаммов микроорганизмов необходимы дальнейшие исследования.

Таким образом, было установлено, что все отобранные активные штаммы термо- и галотолерантных нефтеокисляющих микроорганизмов обладают эмульгирующей активностью и на штаммовом уровне ее значения могли различаться. Выделенные штаммы могут быть перспективными для дальнейших исследований по созданию активных консорциумов, используемых для очистки нефтезагрязненных почв в условиях повышенных температур.

Конфликт интересов. Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

Источник финансирования Работа выполнена при поддержке Национальной программы грантов Казахстана на 2018-2020 годы. Финансирование предоставлено Министерством образования и науки Республики Казахстан в рамках бюджетной программы 217 «Развитие науки» и подпрограммы 102 «Грантовое финансирование научных исследований», договор № 102 от 05 марта 2018 года, проект № AP05132128.

Литература

- 1 Hasanuzzaman M., Ueno A., Ito H., Yamamoto Y., Yumoto I., Okuyama H. Degradation of long-chain n-alkanes C36 and C40 by *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG // Int. Biodeterior. Biodegrad. – 2007. – Vol. 59. – P. 40-43.
- 2 Saeki H., Sasaki M., Komatsu K., Miura A., Matsuda H. Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia sp.* strain JE-1058 // Bioresour. Technol. – 2009. – Vol. 100. – P. 572-577.
- 3 Varjani S.J., Upasani V.N. Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: production, characterization and surface active properties of biosurfactant // Bioresour. Technol. – 2016. – Vol. 221. – P. 510-516.
- 4 Al-Wasify R.S., Hamed S.R. Bacterial Biodegradation of Crude Oil Using Local Isolates // International Journal of Bacteriology. – 2014. – <https://doi.org/10.1155/2014/863272>. – 8 p.
- 5 Adnan B. Al-Hawash, Maytham A. Dragh, Shue Li, Ahmad Alhujaily Hayder A. Abbood, Xiaoyu Zhang Fuying M. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment // The Egyptian Journal of Aquatic Research. – 2018. – Vol. 44 (2). – P. 71-76.
- 6 Qin X., Tang J., Li D., Zhang Q. Effect of salinity on the bioremediation of petroleum hydrocarbons in a saline alkaline soil // Lett. Appl. Microbiol. – 2012. – Vol. 55 (3). – P. 210-217.

- 7 Ebadi A., Khoshkholgh Sima N.A., Olamaee M., Hashemi M., Ghorbani N. R. Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* consortium // *J. Adv. Res.* – 2017. – Vol. 8 (6). – P. 627-633.
- 8 Margesin R., Schinner F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 56. – P. 650–663.
- 9 Gauthier M.J., Lafay B., Christen R., Fernandez L., Acquaviva M., Bonin P., Bertrand J.C. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1992. – Vol. 42. – P. 568–576.
- 10 Mnif S., Chamkha M., Sayadi S. Isolation and characterization of *Halomonas* sp. strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hyper saline conditions // *Journal of Applied Microbiology.* – 2009. – Vol. 107. – P. 785–794.
- 11 Ben Ali Gam Z., Abdelkafi S., Casalot L., Tholozan J. L., Oueslati R., Labat M. *Modicisalibacter tunisiensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, moderately halophilic bacterium isolated from an oilfield-water injection sample, and emended description of the family Halomonadaceae Franzmann et al. 1989 emend Dobson and Franzmann 1996 emend Ntougias et al. 2007 // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* – 2007. – Vol. 57. – P. 2307–2313.
- 12 Wang Y.N., Chi C.Q., Cai M., Lou Z.Y., Tang Y.Q., Zhi X.Y. *Amycolicococcus* sub. *flavus* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from a saline soil contaminated by crude oil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2010. – Vol. 60. – P. 638-643.
- 13 Баутиста Х., Эрнандес-Гомес Т., Кардинале М., Колпаков А.И. Багаева Т.В. Выделение галотолерантных нефтеокисляющих бактерий – продуцентов биосурфактантов из прибрежного шельфа северной Кубы // 1-й Российский микробиологический конгресс: Сб. тез. – Москва. Пушино-на-Оке, 17-18 октября, 2017. – С. 139-140.
- 14 Elshafie A.E., Joshi S.J., Al-Wahaibi Y.M., Al-Bemani A.S., Al-Bahry S.N., Al-Maqbali D., Banat I.M. Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in microbial enhanced oil recovery // *Front Microbiol.* – 2015. – Vol.6. – P. 1324-1331.
- 15 Whang L.M., Liu P.W.G., Ma C.C., Cheng S.S. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil // *J Hazard Mater.* – 2008. – Vol.151. – P.155–163.
- 16 Fondi M., Maida I., Perrin E., Orlandini V., La Torre L., Bosi E., Negroni A., Zanolli G., Fava F., Decorosi F., Giovannetti L., Viti C., Vaneechoutte M., Dijkshoorn L., Fani R. Genomic and phenotypic characterization of the species *Acinetobacter venetianus* // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – [https://doi: 10.1038/srep21985](https://doi.org/10.1038/srep21985)
- 17 White D.A., Hird L.C., Ali S.T. Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp., strain PML026 // *J Appl. Microbiol.* – 2013. – Vol.115. – P. 744–755.
- 18 Mohanty S., Jasmine J., Mukherji S. Practical considerations and challenges involved in surfactant enhanced bioremediation of oil // *Biomed. Res. Int.* – 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/328608>
- 19 Aitkeldiyeva S.A., Faizulina E.R., Auezova O.N., Tatarkina L.G., Spankulova G.A. Isolation and study of thermotolerant oil-oxidizing microorganisms // *News of NAS RK, Series of biological and medical.* – 2019. – Vol. 2. – P. 56-62.
- 20 Ягофарова А.Я., Муканова К.Т., Хасенова Э.Ж., Шарипова Г.Ж., Молдагулова Н.Б. Исследование влияния физических факторов на активность биосурфактантов продуцируемых штаммом *Dietzia maris mb3* и изучение их фитотоксичности // *Вестник КазНУ. Сер. Экол.* – 2013. – Вып. 38, №2/2. – С. 409-414.
- 21 Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. – М.: Химия, 1984. – 448 с.
- 22 Sunita J. Varjani Microbial degradation of petroleum hydrocarbons // *Bioresour. Technol.* – 2017. – Vol. 223. – P.277-286.
- 23 Gao Y., Wang J., Xu J., Kong X., Zhao L., Zeng D.-H. Assessing the quality of oil-contaminated saline soil using two composite indices // *Ecol. Indic.* – 2013. – Vol. 24. – P. 105-112.

References

- 1 Hasanuzzaman M., Ueno A., Ito H., Yamamoto Y., Yumoto I., Okuyama H. “Degradation of long-chain n-alkanes C36 and C40 by *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG”. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* Vol. 59 (2007): 40-43.
- 2 Saeki H., Sasaki M., Komatsu K., Miura A., Matsuda H. “Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058”. *Bioresour. Technol.* 100 (2009): 572-577.
- 3 Varjani S.J., Upasani V.N. “Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: production, characterization and surface active properties of biosurfactant”. *Bioresour. Technol.* 221 (2016): 510-516.
- 4 Al-Wasify R.S., Hamed S.R. “Bacterial Biodegradation of Crude Oil Using Local Isolates”. *International Journal of Bacteriology.* (2014): <https://doi.org/10.1155/2014/863272>.
- 5 Adnan B. Al-Hawash, Maytham A. Dragh, Shue Li, Ahmad Alhujaily Hayder A. Abbood, Xiaoyu Zhang Fuying M. “Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment”. *The Egyptian Journal of Aquatic Research.* 44, 2 (2018): 71-76.
- 6 Qin X., Tang J., Li D., Zhang Q. “Effect of salinity on the bioremediation of petroleum hydrocarbons in a saline alkaline soil”. *Lett. Appl. Microbiol.* 55, 3 (2012): 210-217.
- 7 Ebadi A., Khoshkholgh Sima N.A., Olamaee M., Hashemi M., Ghorbani N. R. “Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* consortium”. *J. Adv. Res.* 8, 6 (2017): 627-633.
- 8 Margesin R., Schinner F. “Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments”. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 (2001): 650–663.
- 9 Gauthier M.J., Lafay B., Christen R., Fernandez L., Acquaviva M., Bonin P., Bertrand J.C. “*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium”. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42 (1992): 568–576.

- 10 Mnif S., Chamkha M., Sayadi S. "Isolation and characterization of *Halomonas* sp. strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hyper saline conditions". *J Appl. Microbiol.* 107 (2009): 785–794.
- 11 Ben Ali Gam Z., Abdelkafi S., Casalot L., Tholozan J. L., Oueslati R., Labat M. "Modicisalibacter tunisiensis gen. nov., sp. nov., an aerobic, moderately halophilic bacterium isolated from an oilfield-water injection sample, and emended description of the family Halomonadaceae Franzmann et al. 1989 emend Dobson and Franzmann 1996 emend. Ntougias et al. 2007". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 57 (2007): 2307–2313.
- 12 Wang Y.N., Chi C.Q., Cai M., Lou Z.Y., Tang Y.Q., Zhi X.Y. "Amycolicococcus sub. flavus gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from a saline soil contaminated by crude oil". *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60 (2010): 638-643.
- 13 Bautista H., Ermandes-Gomes T., Kardinal M., Kolpakov A.I. Bagaeva T.V. "Vydelenie galotolerantnyh nefteokislyayushchih bakterij – producentov biosurfaktantov iz pribrezhnogo shel'fa severnoj Kuby [Isolation of halotolerant oil-oxidizing bacteria – producers of biosurfactants from the coastal shelf of northern Cuba]". 1st Russian Microbiological Congress: Abstracts Moscow (2017): 139-140.
- 14 Elshafie A.E., Joshi S.J., Al-Wahaibi Y.M., Al-Bemani A.S., Al-Bahry S.N., Al-Maqbali D., Banat I.M. "Sphorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in microbial enhanced oil recovery". *Front Microbiol.* 6 (2015): 1324-1331.
- 15 Whang L.M., Liu P.W.G., Ma C.C., Cheng S.S. "Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil". *J Hazard Mater.* 151 (2008): 155–163.
- 16 Fondi M., Maida I., Perrin E., Orlandini V., La Torre L., Bosi E., Negroni A., Zanolli G., Fava F., Decorosi F., Giovannetti L., Viti C., Vaneechoutte M., Dijkshoorn L., Fani R. "Genomic and phenotypic characterization of the species *Acinetobacter venetianus*". *Sci. Rep.* 6 (2016): [https://doi: 10.1038/srep21985](https://doi.org/10.1038/srep21985)
- 17 White D.A., Hird L.C., Ali S.T. "Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp., strain PML026". *J Appl. Microbiol.* 115 (2013): 744–755.
- 18 Mohanty S., Jasmine J., Mukherji S. "Practical considerations and challenges involved in surfactant enhanced bioremediation of oil". *Biomed. Res. Int.* (2013): <https://doi.org/10.1155/2013/328608>
- 19 Aitkeldiyeva S.A., Faizulina E.R., Auezova O.N., Tatarkina L.G., Spankulova G.A. "Isolation and study of thermotolerant oil-oxidizing microorganisms". *News of NAS RK, Series of biological and medical.* 2 (2019): 56-62.
- 20 Yagofarova A.Ya., Mukanova K.T., Hasenova E.Zh., SHaripova G.Zh., Moldagulova N.B. "Issledovanie vliyaniya fizicheskikh faktorov na aktivnost' biosurfaktantov produciruemyh shtammom *Dietzia maris* mb3 i izuchenie ih fitotoksichnosti [Study of the influence of physical factors on the activity of biosurfactants produced by the strain *Dietzia maris* mb3 and study of their phytotoxicity]". *Bulletin of KazNU. Ser. Ecol.* 38, 2/2 (2013): 409-414.
- 21 Lur'e Yu.Yu. *Analiticheskaya himiya promyshlennyh stochnyh vod [Analytical chemistry of industrial wastewater].* M.: Chemistry, 1984.
- 22 Sunita J. Varjani "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons". *Bioresource Technology.* 223 (2017): 277-286.
- 23 Gao Y., Wang J., Xu J., Kong X., Zhao L., Zeng D.-H. "Assessing the quality of oil-contaminated saline soil using two composite indices". *Ecol. Indic.* 24 (2013): 105-112.