

УДК: 502.36

Ж.К. Мусаева, К.М. Мусаев, Г.Ш. Тлепиева

Каспийский Государственный университет технологий и инжиниринга имени Ш. Есенова,
Республика Казахстан, г. Актау
E-mail: janna_mag@mail.ru

Скрининг консорциума углеводородокисляющих микроорганизмов Северного Каспия

Из морских вод в районе наливных причалов Актауского морского порта и порта Баутино (Северный Каспий) выделено 27 углеводородокисляющих изолятов микроорганизмов, обладающих способностью к деструкции нефти, из данных штаммов отобрано 4 наиболее активные культуры, которые были идентифицированы как *Bacillus cereus* (2 штамма), штамм *Bacillus sp.13* и *Acinetobacter sp.10*. Для создания консорциума отобраны штаммы, деструкционная активность данных штаммов составляет 76% убыли нефти по отношению к контролю.

Ключевые слова: Северный Каспий, нефть и нефтепродукты, углеводородокисляющие штаммы микроорганизмов, консорциум, самоочищение, деструкция нефти.

Ж.К. Мусаева, К.М. Мусаев, Г.Ш. Тлепиева

Солтүстік Каспий теңізіндегі көмірсутек тотықтыратын микроорганизмдердің консорциумының скринингі

Актау теңіз порты мен Баутино порттарының құю причалдары орналасқан жерлердегі теңіз суынан микроорганизмдердің көмірсутек тотықтырушы изоляттары бөлініп алынды. Олардың мұнай ыдыратқыш қабілеттері анықталып, арасынан активтірек штамм таңдалып алынып *Bacillus cereus* (2 штамма), *Bacillus sp.13* и *Acinetobacter sp.10* сияқты штамдарға сәйкестендірілді. Таңдап алынған штамдар консорциумын жасау үшін осы штамдардың ыдыратқыш активтіліктері судағы мұнайдың бастапқы мөлшерінен 76% құрайды.

Түйін сөздер: Каспийдің солтүстік бөлігі, мұнай және мұнай өнімдері, микроорганизмдердің көмірсутек тотықтырғыш штамдары, консорциум, өздігінен тазалану, мұнайды ыдырату.

Zh.K. Musayeva, K.M. Musayev, G.Sh. Tlepiyeva

Screening of consortium hydrocarbon-oxidizing microorganisms of the North Caspy

From the sea water in bulk berths Aktau sea port and the port of Bautino (North Caspian) allocated 27 hydrocarbon isolates of microorganisms having the ability to oil degradation of these strains selected the 4 most active cultures, which were identified as *Bacillus cereus* (2 strains), strain *Bacillus sr.13* and *Acinetobacter sr.10*. To create a consortium of selected strains of destructive activity of these strains was 76% loss of oil relative to the control.

Keywords: Northern Caspian oil and petroleum products, hydrocarbon-oxidizing microbial strains, the consortium, self-cleaning, destruction of oil.

Введение

Самоочищение морей и океанов – сложный процесс, при котором происходит разрушение компонентов загрязнения и включения

их в общий круговорот веществ. В процессе самоочищения водоемов от нефтяных загрязнений основную роль играют микроорганизмы воды, входящие в состав планктона и бентоса.

В настоящее время активно внедряются биотехнологические методы защиты окружающей среды от техногенных загрязнений, основаны такие методы на использовании микроорганизмов-деструкторов.

Для очистки морских акваторий от нефтяного загрязнения наиболее продуктивным является использование аборигенных микроорганизмов, которые развиваются в местах нефтяного загрязнения и обладают более высоким углеводородокисляющим потенциалом в результате индукции специфических ферментов и пластичности метаболизма [9]. В результате именно микроорганизмы используются в основе биопрепаратов, используемых для интенсификации процессов самоочищения в акватории.

Поэтому поиск микроорганизмов, обладающих свойствами, активизирующими процесс самоочищения от нефтяного загрязнения, является актуальным.

Целью данной работы явился поиск и изучение активных углеводородокисляющих микроорганизмов, выделенных в районе наливных причалов Актауского морского порта и порта Баутино в районе Северного Каспия.

Методы исследования

Выделение углеводородокисляющих микроорганизмов, изучение их культуральных, морфологических и деструкционных свойств, а также получение чистых культур проводили методом накопительных культур с использованием жидкой минеральной среды М9 и добавлением нефти и нефтепродуктов (бензин, дизельное топливо) 1 % по объему [2, 4, 6, 8].

Первоначальный скрининг активных микроорганизмов-нефтедеструкторов проводили методом лунок по Егорову [7].

Предварительную идентификацию выделенных микроорганизмов проводили по культурально-морфологическим признакам, используя «Определитель бактерий Берджи» [5].

Способность выделенных изолятов к деструкции нефти изучали на стерильной морской воде, в которую вносили стерильную нефть в количестве 1% по отношению к объему стерильной морской воды, суспензии исследуемых штаммов вносили по 2% по объему. Титр клеток составлял 10^6 - 10^7 кл/мл. Содержание нефтепродуктов в эксперименте определяли гравиметрическим методом после 15 суток экспозиции, в качестве элюента использовали хлороформ. Экстракцию

в опытных и контрольных образцах проводили хлороформом в соотношении 1:1 в течение 12 часов. Убыль углеводов определяли по отношению к контролю без внесения штаммов, который имитировал убыль нефтяных фракций за счет физико-химических процессов [1, 3].

Статистическую обработку данных гидрохимических и микробиологических исследований проводили с помощью программы STATISTICA 6.0, Microsoft Excel Office XP.

Результаты исследования

Для скрининга УОМ были поставлены накопительные культуры на жидкой среде М9 с добавлением проб морской воды и внесением нефти и нефтепродуктов: дизельное топливо и бензин.

Было поставлено 24 накопительные культуры на минеральной среде с нефтью и нефтепродуктами. В результате эксперимента установлено, что численность и активность микрофлоры в районе Баутинского порта выше, чем в воде Актаунского морского порта. Наиболее интенсивный рост углеводородокисляющих микроорганизмов отмечен в накопительных культурах с морской водой Баутинского порта с нефтью и дизельным топливом. Из этих накопительных культур были сделаны высевы на плотную среду М9 с внесением тех же нефтепродуктов, что и в накопительных культурах. В результате посева было выделено 27 изолятов (нумерация от 1 до 27), которые использовали для определения способности этих штаммов окислять жидкие не летучие углеводороды методом лунок по Егорову. В результате данного исследования установлено, что 9 штаммов способны к росту в присутствии всех исследуемых нефтепродуктов. Штаммы №5, 7, 10, 12, 13, 20, 23, 26, 27 обладают способностью к окислению нефтепродуктов. Данные штаммы были отобраны для дальнейших исследований на способность к деструкции нефти гравиметрическим методом. После двухнедельной экспозиции экспериментальных колб с морской водой и нефтью и экстракции хлороформом определяли вес сухого остатка нефти. Результат взвешивания выражали в процентах относительно контроля, который имитировал физико-химические процессы разложения нефти в воде. Таким образом, в результате данного эксперимента учитывалась непосредственно микробная убыль нефти. Результаты данного эксперимента представлены на рисунке 1.

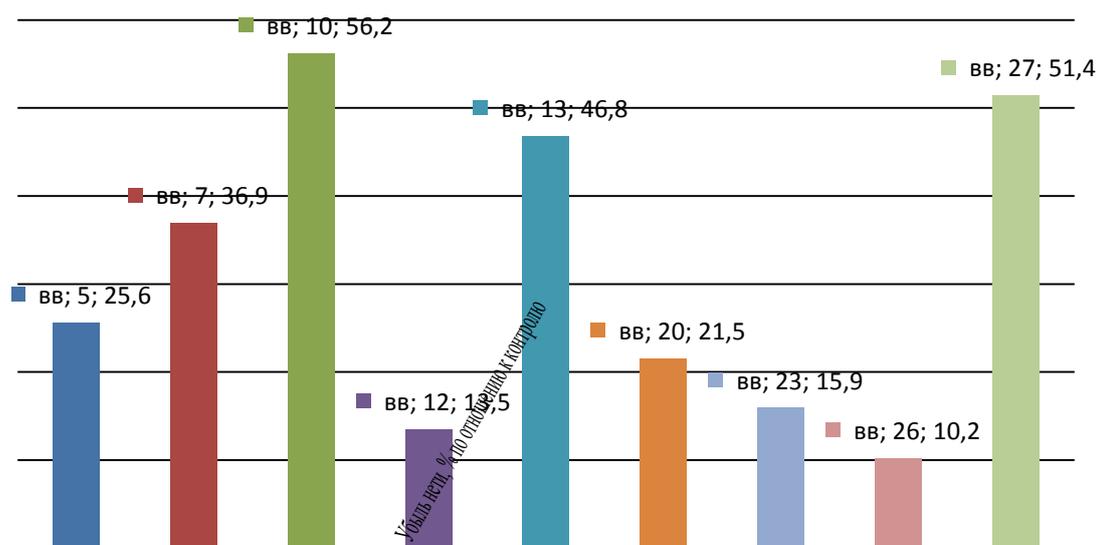


Рисунок 1 - Убыль нети, % по отношению к контролю

Таблица 1 – Характер роста чистых культур на различных средах

№ культуры	Рост на МПБ	Рост на МПА	Рост на М9 с нефтью
№ 7	Обильный рост в виде ватных хлопьев, взвешенных комков	Колонии крупные, более 2 см в диаметре, разрастаются по агару, с неровным бахромчатым краем, складчатые, выпуклые, матовые, цвет серый	Колонии точечные, выпуклые, серого цвета, матовые, край колоний ровный, слизистой консистенции
№ 10	Слабый рост в виде пленки на поверхности среды	колонии крупные, круглые с ровным краем, слизистые, прозрачные, бежевого цвета	колонии точечные, выпуклые, глянцевые, серо-розового цвета, слизистые
№ 13	Равномерное помутнение среды	колонии круглые с ровным краем, слизистые, цвет бежевый, выделяет черный пигмент в среду	точечные, выпуклые, глянцевые, серого цвета
№ 27	Слабый рост в виде пленки на поверхности среды	колонии круглые с неровным эрозированным краем, выпуклые, матовые, цвет серый, образует серый пигмент	колонии точечные, выпуклые, серого цвета, матовые

Таблица 2 – Результаты исследования морфологических свойств чистых культур

№ культуры	Окраска по Граму	Определение кислотоустойчивости бактерий методом Циля-Нильсена	Окраска спор бактерий методом Циля-Нильсена в модификации Мюллера
№ 7	Г+ палочки, 0,8x2,7 мкм	Некислотоустойчивые, окрашиваются в красный цвет	Наличие спор, окрашенных в ярко-красный цвет. Vegetативные клетки прокрашены в голубой цвет
№ 10	Г- короткие палочки и кокки, 1x2 мкм	Кислотоустойчивые, окрашиваются в красный цвет	Споры отсутствуют, окрашены только вегетативные клетки в голубой цвет
№ 13	Г+ палочки, 0,6x3,5 мкм	Некислотоустойчивые, окрашиваются в красный цвет	Наличие спор, окрашенных в ярко-красный цвет
№ 27	Г+ крупные палочки, 1,2 x 4 мкм	Некислотоустойчивые, окрашиваются в красный цвет	Наличие спор, окрашенных в ярко-красный цвет

В результате данного эксперимента установлено, что среди отобранных 9 активных штаммов только 4 штамма способны к интенсивной деструкции нефти с показателями выше 30% по отношению к контролю. Наиболее активными оказались штаммы № 7 с деструкцией нефти 36,9%, № 13 с деструкцией 46,8%, № 27 – 51,4% и наиболее активным оказался штамм № 10, у которого деструкция достигала 56,2% убыли нефти относительно контроля. Таким образом, данные штаммы отобраны для дальнейших исследований.

Проведена первичная идентификация полученных активных нефтедеструктирующих чистых культур. Исследование проводили на жидких и плотных питательных средах, результаты представлены в таблице 1.

В результате проведенного исследования отмечено, что у 2 штаммов (№ 10 и 27) при росте на жидкой среде наблюдается слабый рост с образованием пленки на поверхности среды. У

штамма №13 отмечено равномерное помутнение среды. Наиболее интенсивный рост с образованием хлопьев и комков отмечено для штамма №7 (табл. 1).

При росте на МПА отмечено, что среди исследуемых культур для 2 штаммов (№13 и 27) характерно появление пигмента на поверхности питательного агара, колонии всех штаммов характеризуются крупными размерами, интенсивно разрастаются по поверхности среды. Штаммы №7 и 27 характеризуются матовой поверхностью колоний, для штаммов №10 и 13 поверхность глянцевая. При росте на среде М9 для всех штаммов отмечен рост точечных выпуклых колоний. Штаммы №7 и 27 на среде М9 матовые, а штаммы №10 и 13 глянцевые.

При изучении цитохимических свойств исследуемых штаммов отмечено, что для 3 штаммов характерно отсутствие кислотоустойчивости клеточных стенок. Результаты представлены в таблице 2.

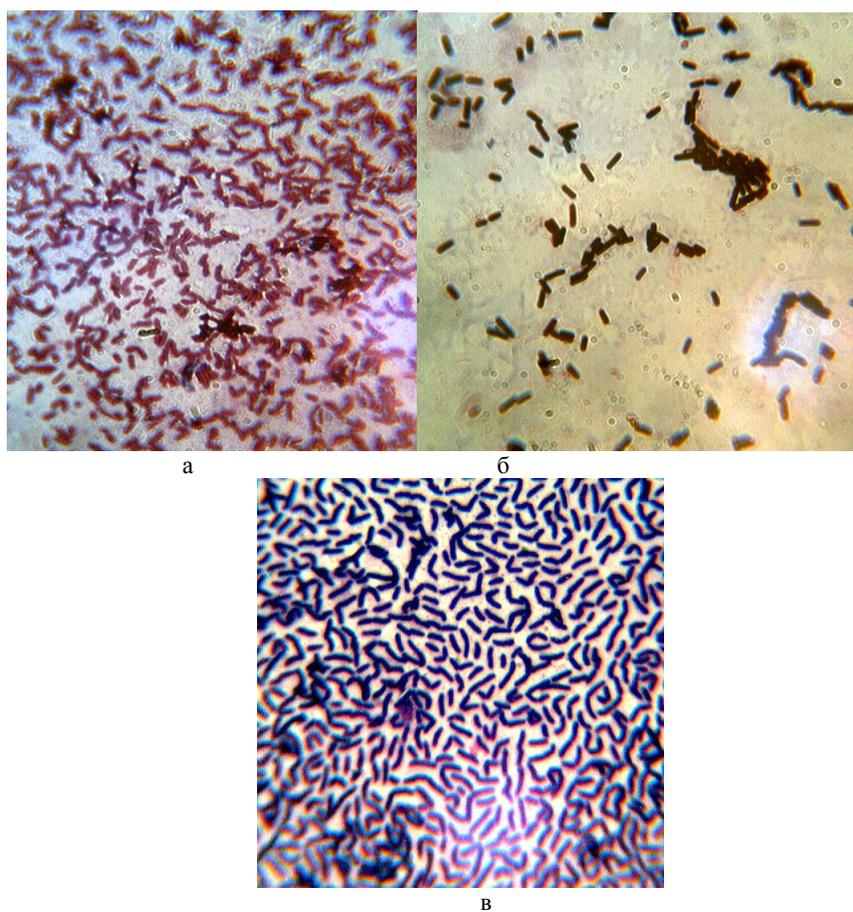


Рисунок 2 – Клетки чистых культур штаммов:
а – №7, б – № 13, в – № 27, окраска по Граму, х 40

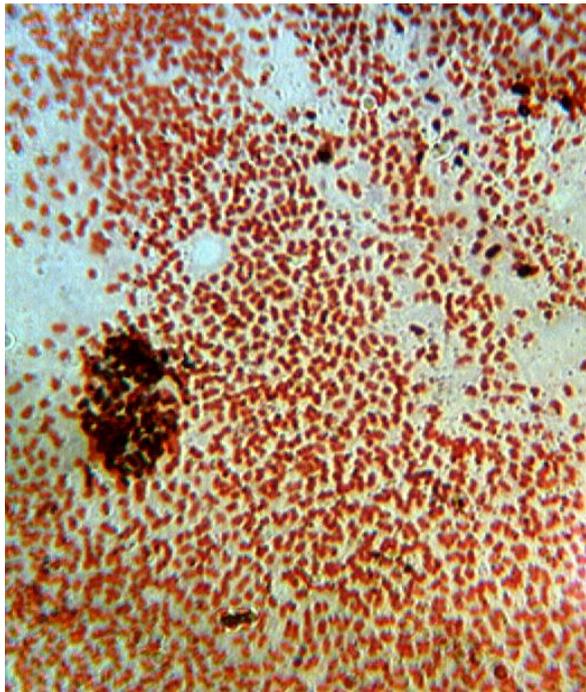


Рисунок 3 – Клетки чистой культуры штамма № 10, окраска по Граму, х 40

В результате проведенного исследования отмечено, что 3 штамма являются Г⁺ спорообразующими палочками (табл. 2). Все исследуемые штаммы являются аэробами, и можно предположить, что эти 3 штамма относятся к группе грамположительных палочек, образующих эндоспоры к роду *Bacillus*. Данные штаммы окра-

шиваются по Граму в фиолетовый цвет, палочки правильной формы, одиночные (рисунок 2).

Штамм № 10 (S-8) при окраске по Граму окрашивается в красный цвет, т.е. Г⁻ микроорганизм, клетки кокковой формы или в виде коротких палочек (рисунок 3).

В результате проведенного исследования отмечено, что штамм № 10 не образует эндоспор и является кислотоустойчивым штаммом.

С данными штаммами проведен ряд биохимических тестов на определение сахаролитических, протеолитических активностей, способности к образованию аммиака, индола и сероводорода.

В результате проведенного исследования с помощью определителя Берджи [5] установлено, что штаммы № 7 и 27 отнесены к виду *Bacillus cereus*, штамм № 13 *Bacillus sp.*, штамм № 10 *Acinetobacter sp.*

Вид *Bacillus cereus* относится к условно-патогенной микрофлоре, способен вызывать пищевые токсикоинфекции, продуцирует энтеротоксины. Такой вид бактерий не используется в составе биопрепаратов без дополнительного исследования токсичности штаммов и их метаболитов на теплокровных животных. Соответственно, данные штаммы для создания углеводородокисляющего консорциума использоваться не могут и в дальнейших исследованиях данные штаммы не применялись.



Рисунок 4 - Эксперимент на убыль нефти в морской воде: а - контроль, б - консорциум штаммов *Bacillus sp.* 13 и *Acinetobacter sp.* 10

Со штаммами *Bacillus sp.13* и *Acinetobacter sp. 10* создан консорциум микроорганизмов. Методом математического анализа установлено, что в данном консорциуме *Bacillus sp.13* относится к наиболее часто встречаемому виду, т. е. к доминирующей форме (72%), от всех изучаемых микроорганизмов в популяции. Бактерии *Acinetobacter sp. 10* являются содоминантной культурой (28%).

Данный консорциум был проверен на способность к утилизации нефти гравиметрическим методом. Исследование проводили в течение 15 суток на морской воде с внесением нефти (1% по объему) и смешанной культуры микроорганизмов (2% по объему).

Выращивание осуществляли на термостатированной качалке при 180 об/мин и температуре 25°C. опыты ставились в трех повторностях. Контролем служили: морская вода с культурой без нефти, морская вода и нефть без бактерий. По истечении 15 суток в опытных колбах наблюдается значительное уменьшение количества нефти

(рисунок 4). О биотрансформации нефти судили в результате гравиметрического анализа, предварительно экстрагируя нефть хлороформом.

В результате проведенного исследования установлено, что консорциум штаммов способен к деструкции нефти на 76% относительно контроля, где протекают только физико-химические процессы разложения нефти.

Таким образом, проведен скрининг углеводородокисляющих микроорганизмов, выделены наиболее активные изоляты, из которых путем скрининга отобраны 2 штамма *Bacillus sp.13* и *Acinetobacter sp. 10*. Из данных штаммов составлен жизнеспособный консорциум микроорганизмов, который на 72% состоит из штамма *Bacillus sp.13* и на 28% из штамма *Acinetobacter sp. 10*. Данный консорциум исследован на способность к деструкции нефти и отмечена высокая деструкционная активность до 76%, что делает данную ассоциацию микроорганизмов перспективной для ликвидации нефтяного загрязнения морских вод Каспийского моря.

Литература

- 1 Белоусова Н.И., Шкидченко А.Н. Деструкция нефтепродуктов различной степени конденсации микроорганизмами при пониженных температурах / Н.И. Белоусова, А.Н. Шкидченко // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. - Т. 40. - №3. - С. 312-316.
- 2 Дзержинская И.С. Питательные среды для выделения и культивирования микроорганизмов / И.С. Дзержинская. – Астрахань.: Изд-во АГТУ, 2008. - 348 с.
- 3 Другов Ю. С. Экологическая аналитическая химия / Ю.С. Другов. - СПб.: Изд-во Анатолия, 2000. – 432 с.
- 4 Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. Д.Г. Звягинцева. - М.: изд-во МГУ, 1991. - 304 с.
- 5 Определитель бактерий Берджи: в 2-х т / под ред. Дж. Хоулта. - М.: Мир, 1997. - 800 с.
- 6 Павлова О.Н. Исследование микробного сообщества озера Байкал в районе естественны нефтепроявлений / О.Н. Павлова, Т.И. Земская, А.Г. Горшков, В.А. Парфенова, М.Ю. Сулова, О.М. Хлыстов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44. - № 3. – С. 319-323.
- 7 Руководство к практическим занятиям по микробиологии: учеб. пособ. / под ред. Н.С. Егорова. - Изд. 3-е. перераб. и доп.- М.: Изд-во Моск. ун - та, 1995. - 224с.
- 8 Тумайкина Ю.А., Турковская О.В., Игнатов В.В. Деструкция углеводов и их производных растительно-микробной ассоциацией на основе элодеи канадской / Ю.А. Тумайкина, О.В. Турковская, В.В. Игнатов // Прикладная биохимия и микробиология. - 2008. – Т. 44. - № 4. - С. 422-429.
- 9 Leahy J.G., Colwell R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment // Microbiol. Rev. - 1990. - vol.54. - p. 305-315.

References

- 1 Belousova N.I., Shkidchenko A.N. Destrukcija nefteproduktov razlichnoj stepeni kondensacii mikroorganizmami pri ponizhennyh temperaturah / N.I. Belousova, A.N. Shkidchenko // Prikladnaja biohimija i mikrobiologija. – 2004. - Т. 40. - №3. - S. 312-316.

- 2 Dzerzhinskaja I.S. Pitatel'nye sredy dlja vydelenija i kul'tivirovanija mikroorganizmov / I.S. Dzerzhinskaja. – Astrahan': Izd-vo AGTU, 2008. - 348 s.
- 3 Drugov Ju. S. Jekologičeskaja analitičeskaja himija / Ju.S. Drugov. - SPb.: Izd-vo Anatolija, 2000. – 432 s.
- 4 Metody pochvennoj mikrobiologii i biohimii / Pod red.D.G. Zvjaginceva. - M.: izd-vo MGU, 1991. - 304 s.
- 5 Opredelitel' bakterij Berdzhii: v 2-h t / Pod red. Dzh. Houlta. - M.: Mir, 1997. - 800 s.
- 6 Pavlova O.N. Issledovanie mikrobnogo soobshhestva ozera Bajkal v rajone estestvenny nefteprojavlenij / O.N. Pavlova, T.I. Zemskaja, A.G. Gorshkov, V.A. Parfenova, M.Ju. Suslova, O.M. Hlystov // Prikladnaja biohimija i mikrobiologija. – 2008. – T. 44. - № 3. – S. 319-323.
- 7 Rukovodstvo k praktičeskim zanjatijam po mikrobiologii: Učeb. posob. / pod red. N.S. Egorova. - Izd. 3-e. pererab. i dop.- M.: Izd-vo Mosk. un - ta, 1995. - 224s.
- 8 Tumajkina Ju.A., Turkovskaja O.V., Ignatov V.V. Destrukcija uglevodorodov i ih proizvodnyh rastitel'no-mikrobnoj asociacije na osnove jelodei kanadskoj / Ju.A. Tumajkina, O.V. Turkovskaja, V.V. Ignatov // Prikladnaja biohimija i mikrobiologija. - 2008. – T. 44. - № 4. - S. 422-429.
- 9 Leahy J.G., Colwell R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment // Microbiol. Rev. - 1990. - vol.54. - p. 305-315.