

УДК 502.3:579.66:579.68

Э.Р. Файзулина*, С.А. Айткельдиева, О.Н. Ауэзова,
Л.Г. Татаркина, Е.А. Свирко

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Казахстан, г. Алматы
*e-mail: ecomicrolab@gmail.com

Нефтеокисляющие микроорганизмы, перспективные для очистки морской среды

Из нефтезагрязненной воды и донных отложений Каспийского моря выделены и отобраны активные штаммы бактерий, эффективно утилизирующие нефть месторождений Прикаспийского региона. Изучены их культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки, на основе которых определена видовая принадлежность. Созданные на основе отобранных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов наиболее активные ассоциации утилизировали 84,1-89% нефти при ее 10%-ном содержании в среде.

Ключевые слова: Каспийское море, нефтезагрязненная вода, донные отложения, нефтеокисляющие микроорганизмы, деструкция, биоремедиация

Э.Р. Файзулина, С.А. Айткельдиева, О.Н. Ауэзова, Л.Г. Татаркина, Е.А. Свирко
Теңіз ортасын газартуда мұнайотықтырғыш микроорганизмдердің перспективтілігі

Каспий теңізінің мұнаймен ластанған суынынан және шөгінділерінен Каспий аймағының мұнайын тиімді пайдаға асыратын белсенді бактериялар штамдары бөліп алынды. Түрлік ерекшелігіне қарай олардың культуралық-морфологиялық және физиология-биохимиялық белгілері зерттелді. Бөлініп алынған штамдардың негізінде жасалған мұнайотықтырғыш микроорганизмдердің ең белсенді ассоциациялары орта құрамындағы 10%-дық мұнайдың 84,1-89% пайдаға асырды.

Түйін сөздер: Каспий теңізі, мұнаймен ластанған су, шөгінділер, мұнайотықтырғыш микроорганизмдер, деструкция, биоремедиация

E.R. Faizulina, S.A. Aitkeldiyeva, O.N. Auezova, L.G. Tatarkina, E.A. Svirko
Oil-oxidizing microorganisms, perspective for purification of the marine environment

Active strains of bacteria, effectively utilized the oil from the fields of the Caspian region, isolated and selected from oil-contaminated water and sediments of the Caspian Sea. Their culture-morphological and physiological and biochemical features are studied, on this basis species affiliation is determined. The most active associations created on the basis of selected strains of oil-oxidizing microorganisms utilized 84,1-89% of oil at its 10%-rated content in the medium.

Key words: the Caspian Sea, oil-contaminated water, sediments, oil-oxidizing microorganisms, destruction, bioremediation

Нефтяные загрязнения относятся к числу наиболее массовых и опасных по своим последствиям проявлений антропогенного воздействия на природные экосистемы. В воды рек, озер и Мирового океана ежегодно по разным причинам поступает от 2 до 10 млн. тонн нефти [1].

Особенностью морской добычи является повышенная вероятность утечки нефти, а также возникновение аварий, сопровождающихся вы-

бросом в атмосферу и водную среду опасных загрязнителей: углеводородных токсичных газов, химических реагентов, буровых растворов и т.п. Попавшие в море нефть и нефтепродукты могут переноситься по поверхности от мест разлива на большие расстояния под действием ветров и течений. Покрывая поверхность воды, нефть оказывает губительное воздействие на все водные организмы. Хроническое загрязнение вызывает

сокращение видового разнообразия водных растений и животных, что губительно сказывается на стабильности экосистемы [2].

После попадания нефти в водную экосистему ее состав подвергается постоянным изменениям под действием физико-химических и биологических факторов: растворение, испарение, адсорбция, фотоокисление, биodeградация и т.д. [3]

Существуют разные способы борьбы с нефтяными загрязнениями в водной среде. Механические методы заключаются в сборе и транспортировке собранных нефтепродуктов специальными судами и дальнейшей их утилизации.

Кроме механических способов **борьбы с загрязнением моря** нефтепродуктами существует ряд других, основанных на использовании физико-химических свойств нефти, например, обработка нефтяного пятна поверхностно-активными веществами – диспергентами, детергентами, эмульгаторами и собирателями нефти.

Биodeградация углеводородов нефти микроорганизмами-деструкторами является одним из основных механизмов, с помощью которого нефть и другие углеводородные поллютанты удаляются из окружающей среды. Наиболее перспективным способом очистки является биоремедиация с помощью нефтеокисляющих микроорганизмов, внесенных в загрязненную среду [4, 5].

Оптимальным вариантом решения проблемы очистки морских вод является разработка препаратов, обладающих свойствами сорбентов и препаратов на основе микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти [6, 7].

Целью настоящей работы было выделение нефтеокисляющих микроорганизмов из Каспийского моря и изучение их деструкционной способности.

Материалы и методы исследований

Выделение нефтеокисляющих микроорганизмов из морской воды Каспийского моря проводили методом накопительных культур на среде Ворошиловой-Диановой (ВД) 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, NaCl – 10,0, pH 7,0-7,2. В качестве источника углерода и энергии использовали нефть в количестве 1%.

Выделение чистых культур нефтеокисляющих бактерий проводили чашечным методом на среде рыбо-пептонный агар (РПА) при 28°C.

Способность выделенных культур расти на нефти, как единственном источнике углерода, изучали на среде ВД. В колбы Эрленмейера со 100 мл стерильной среды вносили по 2 мл инокулята и добавляли по 3% нефти. Рост оценивали визуально по 4-бальной шкале на 14-е сутки.

Для определения видовой принадлежности активных нефтеокисляющих штаммов микроорганизмов изучали их морфологические, культуральные, физиологические и биохимические свойства в соответствии с современными принципами классификации и по определителю Берджи [8].

Для изучения взаимоотношений нефтеокисляющих микроорганизмов использовали метод перпендикулярных штрихов.

Для изучения нефтеокисляющей активности отобранных штаммов и ассоциаций использовали среду ВД. В качестве единственного источника углерода в среду вносили нефть (5-10%). Культивирование микроорганизмов проводили в колбах Эрленмейера, содержащих 100 мл среды, на круговой качалке (180 об./мин.) при 28°C в течение 14 суток. Суммарное содержание углеводородов нефти в среде определяли газохроматографическим методом в ДГП «Центр физико-химических методов анализа» РГП КазНУ им. Аль-Фараби.

Результаты исследований и обсуждение

Из морской воды, отобранной в районе морского порта г. Актау, методом накопительных культур было выделено 60 культур нефтеокисляющих микроорганизмов. Был проведен предварительный визуальный отбор активных штаммов при культивировании на минеральной среде с нефтью, которую вносили в количестве 3%. О биодеструкции углеводородов нефти судили по изменению или исчезновению нефтяной пленки на поверхности среды, стенках колб и по накоплению биомассы.

В результате было отобрано 22 культуры. Из них 10 штаммов показали активность 3 балла и 12 штаммов – 4 балла. Остальные культуры показали слабый рост.

После последовательных высевов культур, проявляющих активность 3 и 4 балла, на среду с нефтью в концентрации 5% наиболее активными оказались 12 бактериальных штаммов. При

их росте с поверхности среды исчезала нефтяная пленка, наблюдался обильный прирост биомассы, за счет чего среда приобретала ярко желтый оттенок и становилась мутной.

Был проведен скрининг среди 42 коллекционных культур нефтеокисляющих микроорганизмов, которые были выделены ранее из донных отложений Каспийского моря и прибрежной почвы. В результате было отобрано 8 штаммов, показавших активность 4 балла: штаммы, выделенные из почвенных образцов - *Micrococcus roseus* 34, *Micrococcus roseus* 40, *Micrococcus roseus* 6-A, *Rhodococcus erythropolis* 7-A; штаммы, выделенные из донных отложений Каспийского моря - *Arthrobacter luteus* 43-A, *Arthrobacter* sp. 12Т, *Arthrobacter* sp. 15Т, *Dietzia maris* 84Т.

Была изучена нефтеокисляющая активность отобранных культур при культивировании на минеральной среде с 5% нефтью (таблица 1).

Результаты исследования показали, что все штаммы активно окисляли нефть, при этом степень деструкции составила более 60%. Все коллекционные штаммы показали высокую деструкционную способность. Содержание нефти при их культивировании снизилось на 71,3-85,7%.

Вновь выделенные культуры утилизировали 60,9-86,8% нефти. Наибольшую активность показали пять культур 16Ш, 23Ш, 24Ш, 25Ш и 26Ш, у которых степень деструкции нефти составила свыше 80%.

Таким образом, для дальнейших исследований по созданию эффективных ассоциаций было отобрано 15 наиболее активных культур.

Изучены культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства отобранных новых активных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов.

На основании результатов штаммы идентифицированы следующим образом: 10Ш, 13Ш и 16Ш – *Pseudomonas* sp., 23Ш – *Enterobacter* sp., 24Ш, 25Ш и 26Ш – *Tetrathlobacter minigarde*.

С целью создания препаратов, перспективных для биоремедиации загрязненной морской воды, проведен подбор штаммов-партнеров для получения устойчивых и продуктивных ассоциаций нефтеокисляющих микроорганизмов. Для подбора штаммов исследовали наличие или отсутствие антагонизма между культурами, характеризующимися повышенной нефтеде-

структивной активностью. Антагонистическую активность определяли методом перпендикулярных штрихов. Результаты исследования показали их взаимную толерантность друг к другу.

На основании результатов изучения антагонистической активности были составлены следующие ассоциации:

1 *Pseudomonas* sp. 10Ш + *Micrococcus roseus* 40;

2 *Pseudomonas* sp. 13Ш + *Arthrobacter* sp. 12Т;

3 *Pseudomonas* sp. 13Ш + *Micrococcus roseus* 34;

4 *Pseudomonas* sp. 16Ш + *Dietzia maris* 84Т;

5 *Pseudomonas* sp. 10Ш + *Pseudomonas* sp. 13Ш;

6 *Pseudomonas* sp. 10Ш + *Micrococcus roseus* 34 + *Arthrobacter* sp. 12Т;

7 *Pseudomonas* sp. 13Ш + *Micrococcus roseus* 40 + *Arthrobacter* sp. 15Т;

8 *Pseudomonas* sp. 16Ш + *Rhodococcus erythropolis* 7-A + *Dietzia maris* 84Т;

9 *Pseudomonas* sp. 16Ш + *Acinetobacter calcoaceticus* 2-A + *Arthrobacter luteus* 43-A;

10 *Pseudomonas* sp. 16Ш + *Micrococcus roseus* 6-A + *Micrococcus roseus* 40;

11 *Enterobacter* sp 23Ш + *Micrococcus roseus* 40;

12 *Tetrathlobacter minigarde* 24Ш + *Arthrobacter* sp. 12Т;

13 *Tetrathlobacter minigarde* 25Ш + *Arthrobacter* sp. 15Т;

14 *Tetrathlobacter minigarde* 26Ш + *Dietzia maris* 84Т;

15 *Enterobacter* sp 23Ш + *Tetrathlobacter minigarde* 24Ш;

16 *Enterobacter* sp 23Ш + *Micrococcus roseus* 34 + *Arthrobacter* sp. 12Т;

17 *Tetrathlobacter minigarde* 24Ш + *Arthrobacter* sp. 15Т + *Micrococcus roseus* 40;

18 *Tetrathlobacter minigarde* 26Ш + *Rhodococcus erythropolis* 7-A + *Dietzia maris* 84Т;

19 *Tetrathlobacter minigarde* 25Ш + *Acinetobacter calcoaceticus* 2-A + *Arthrobacter luteus* 43-A;

20 *Pseudomonas* sp. 16Ш + *Enterobacter* sp 23Ш + *Tetrathlobacter minigarde* 24Ш + *Tetrathlobacter minigarde* 25Ш + *Tetrathlobacter minigarde* 26Ш.

Изучена углеводородоокисляющая активность созданных ассоциаций при росте на ми-

Таблица 1 – Оценка деструктивной активности нефтеоокисляющих микроорганизмов, выделенных из Каспийского моря

Штамм	Степень деструкции нефти, %
1	2
<i>Micrococcus roseus</i> 34	78,6
<i>Micrococcus roseus</i> 40	79,3
<i>Micrococcus roseus</i> 6-A	76,7
<i>Rhodococcus erythropolis</i> 7-A	71,3
<i>Arthrobacter luteus</i> 43-A	78,9
<i>Arthrobacter sp.</i> 12Г	76,5
<i>Arthrobacter sp.</i> 15Г	77,4
<i>Dietzia maris</i> 84Г	85,7
2 Ш	65,1
5 Ш	60,9
6 Ш	63,5
9Ш	63,8
10 Ш	67,4
13 Ш	75,2
14Ш	62,6
16 Ш	84,8
23 Ш	85,7
24 Ш	86,8
25 Ш	81,3
26 Ш	87,1
контроль	15,1

неральной среде Ворошиловой-Диановой с 10% нефти. Результаты представлены в таблице 2.

Из данных таблицы видно, что в контроле содержание нефти снизилось на 26,9%. Такая высокая естественная убыль связана с тем, что нефти, входящие в смесь, легкие и летучие.

Внесение ассоциаций привело к увеличению процента деструкции на 23,3-62,1%. Две ассоциации №1 и 11 утилизировали менее 40% нефтяной смеси. Девять ассоциаций №№4, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20 потребляли свыше 60% нефти.

Самыми активными были ассоциации №№20, 15, 18 и 16, у которых степень деструкции нефти была свыше 80%.

Таким образом, из нефтезагрязненной воды и донных отложений Каспийского моря выделены и отобраны активные штаммы бактерий, эффективно утилизирующие нефть месторождений Прикаспийского региона. Созданные на их основе наиболее активные ассоциации способны утилизировать 84,1-89% нефти при ее 10%-ном содержании в среде.

Литература

- 1 Кураков А.В., Ильинский В.В., Котелевцев С.В., Садчиков А.П. Биоиндикация и реабилитация экосистем при нефтяных загрязнениях. – М.: Графикон, 2006. - 336с.
- 2 Миронов О.Г. Бактериальная трансформация нефтяных углеводородов в прибрежной зоне моря //Морской экологический журнал. – 2002. – Т.1, №1 – С. 56-66.
- 3 Сидоров А. В. Управляемая биоремедиация нефтяных загрязнений в природных водах и производственных стоках: автореф. канд. дис. – М., 2009. – 21 с.
- 4 Файзулина Э.Р., Алиева Р.М., Чулаков Н.Ш. Использование микроорганизмов для биоремедиации нефтезагрязненной морской воды //Известия МОН РК, НАН РК. Серия биол. и мед. – 2000. - №6. – С. 71-73.
- 5 Патент РФ №2160719 «Консорциум штаммов микроорганизмов-деструкторов: *Alcaligenes denitrificans*, *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas maltophilia*, используемый для очистки почв, почвогрунтов, вод от нефти, нефтепродуктов и остаточной замасоченности». Оpubл. 20.12.2000.

6 Gentili A.R., Cubitto M.A., Ferrero M., Rodríguez M.S. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2006. – Vol. 57, №4, - P. 222–228.

7 Radwan S.S., Al-Hasan R.H., Salamah S., Al-Dabbous S. Bioremediation of oily sea water by bacteria immobilized in biofilms coating macroalgae //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2002. – Vol. 50, N 1. – P. 55-59.

8 Определитель бактерий Берджи: в 2-х т. / пер. с англ.; под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997. – 368 с.

Reference

1 Kurakov A.V., Il'inskiy V.V., Kotelevcev S.V., Sadchikov A.P. Bioindikacija i rehabilitacija jekosistem pri neftjanyh zagrjaznenijah. – М.: Графикон, 2006. - 336с.

2 Mironov O.G. Bakterial'naja transformacija neftjanyh uglevodorodov v pribrezhnoj zone morja //Morskoj jekologicheskij zhurnal. – 2002. – Т.1, #1 – S. 56-66.

3 Sidorov A. V. Upravljaemaja bioremediacija neftjanyh zagrjaznenij v prirodnyh vodah i proizvodstvennyh stokah: avtoref. kand. dis. – М., 2009. – 21 s.

4 Fajzulina Je.R., Alieva R.M., Chulakov N.Sh. Ispol'zovanie mikroorganizmov dlja bioremediacii neftezagrjaznennoj morskoj vody //Izvestija MON RK, NAN RK. Serija biol. i med. – 2000. - #6. – S. 71-73.

5 Patent RF #2160719 «Konsorcium shtammov mikroorganizmov-destruktorov: Alcaligenes denitrificans, Alcaligenes eutrophus, Pseudomonas maltophilia, ispol'zuemyj dlja ochistki pochv, pochvogruntov, vod ot nefti, nefteproduktov i ostatochnoj zamazuchennosti». Opubl. 20.12.2000.

6 Gentili A.R., Cubitto M.A., Ferrero M., Rodríguez M.S. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2006. – Vol. 57, №4, - P. 222–228.

7 Radwan S.S., Al-Hasan R.H., Salamah S., Al-Dabbous S. Bioremediation of oily sea water by bacteria immobilized in biofilms coating macroalgae //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2002. – Vol. 50, N 1. – P. 55-59.

8 Определитель бактерий Берджи: в 2-х т. / пер. с англ.; под ред. Дзх. Холта, Н. Крига, П. Снита, Дзх. Стейли, С. Уил'ямса. – М.: Мир, 1997. – 368 с.