

Ассимиляция микроорганизмами углеводородных субстратов и влияние ПАВ на биодеструкцию нефти в различных почвах

А.С. Мурадян, аспирант, **В.М. Самыгин**, д.м.н., профессор, **К.А. Антипова**, магистрант, **Т.А. Гришкина**, к.м.н., **В.В. Максимова**, магистрант, Волгоградский ГТУ; **Е.Ю. Исайкина**, к.б.н., Оренбургский ГАУ

Нефтяные продукты относятся к числу наиболее распространённых загрязнителей биосферы. Для очистки от загрязнённых нефтью и её продуктами природных объектов наряду с другими широкое распространение получили биологические методы, основанные на применении микроорганизмов, способных вовлекать нефтепродукты в свой метаболизм и использовать их в качестве основного источника углерода и энергии [5, 6]. Однако механизмы деструкции разнообразны и во многом зависят от биологических свойств микроорганизмов, физико-химических факторов окружающей среды, а также от химического состава нефти и нефтепродуктов. Поэтому исследования закономерностей роста и субстратной специфичности различных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов и влияния физико-химических факторов на процессы разложения нефти остаются актуальными.

Целью настоящей работы явилось изучение субстратной специфичности и ассимилирующей способности различных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов.

Материалы и методы. В опытах использовали штаммы *Pseudomonas sp.* ТУ10, *Bacillus sp.* ТУ22 и *Rhodococcus sp.* из коллекции ВолГТУ, которые засевали в синтетическую среду М9 [1]. В качестве

субстратов в синтетическую среду добавляли дизельное топливо, моторное масло или сырую нефть в количестве 1%. Среду готовили во флаконах на 50 мл, суточные культуры микроорганизмов засеивали из расчёта 10^8 кл/мл. Флаконы помещали в термостат при 30°C, периодически отбирали пробы для определения концентрации микробной биомассы. Концентрацию биомассы определяли путём посева бактерий на агаровые чашки Петри с последующим подсчётом числа сформировавшихся колоний.

Углеводородокисляющую активность микроорганизмов в искусственно загрязнённой почве проводили в присутствии одного из поверхностно-активных веществ (ПАВ). В опыты отбирали чернозёмную и песчаную почвы в количестве 15 г, которые сушили при комнатной температуре в течение двух суток. Из поверхностно-активных веществ использовали додецилсульфат (лаурилсульфат) натрия (ДСН), твин-80 (полисорбат 80) и тритон X-100. Указанные препараты добавляли в почвенные образцы, инокулированные *Bacillus sp.* ТУ22, *Pseudomonas sp.* ТУ10 и *Rhodococcus sp.*, в концентрациях 0,05, 0,4 и 0,2% соответственно. Нефть добавляли в объёме 5%, исследуемые микроорганизмы вносили из расчёта 10^8 клеток на 1 г почвы. Контрольной служила среда без детергентов. Инокулированную почву оставляли при комнатной температуре в течение 7 сут. Определение углеводородокисляющей активности бактериальных культур осуществляли гравиметрически путём экстракции

из среды остаточного субстрата хлороформом [2]. Степень утилизации субстрата рассчитывали по разнице исходной и конечной концентрации.

Результаты и их обсуждение. При культивировании бактерий в синтетической среде на основе нефти установлено увеличение концентрации биомассы по сравнению с контрольной средой. Увеличение микробной биомассы наблюдалось через 24–48 час., после чего концентрация клеток снижалась, достигая значений, сопоставимых с контрольной средой (табл. 1).

При выращивании в среде с дизельным топливом из трёх бактериальных культур лишь у штамма *Pseudomonas sp.* TY10 произошёл определённый рост, тогда как концентрация биомассы двух других микроорганизмов несколько снижалась по отношению к посевной дозе, оставаясь в пределах $(1,0–4,2) \times 10^6$ кл/мл на протяжении всего опыта. Во всех случаях наиболее высокая концентрация биомассы отмечалась спустя двое суток с момента инокулирования среды бактериальной культурой. При посеве бактерий в среду, содержащую моторное масло, происходило снижение концентрации клеток каждого из трёх исследованных микро-

организмов, особенно заметное к концу опытов (табл. 2).

Микроорганизмы по-разному ассимилировали углеводородные субстраты. Они обладали слабовыраженной активностью в отношении дизельного топлива, утилизируя это углеводородное сырьё не более чем на 2,6% (рис. 1). Наименьшую активность проявляли псевдомонады, более высокие показатели отмечены у представителя рода *Bacillus*. Родококки в этом отношении занимали промежуточное положение. Степень ассимиляции дизельного топлива для трёх видов составила 0,6; 2,6; 2,3% соответственно, хотя в литературе имеются данные о высокой активности некоторых культур к этому субстрату [3]. Вместе с тем все бактериальные штаммы эффективно ассимилировали моторное масло. Родококки за короткий период использовали в качестве единственного источника углерода и энергии примерно половину из внесённого в культуральную среду субстрата (50,1%), а степень утилизации моторного масла двумя другими бактериями приближалась к 80%.

Известно, что некоторые микроорганизмы способны продуцировать растворимые внекле-

1. Динамика роста нефтеоокисляющих микроорганизмов в синтетической среде с сырой нефтью

Микроорганизм	Продолжительность культивирования, сут.	Концентрация биомассы, кл/мл		
		контрольная среда	синтетическая среда с 1% нефти	показатель изменения, %
<i>Bacillus sp.</i> TY22	1	$0,32 \times 10^9$	$0,4 \times 10^9$	25,0
	2	$0,35 \times 10^9$	$0,76 \times 10^9$	100,0
	7	$0,15 \times 10^9$	$0,2 \times 10^9$	33,3
<i>Pseudomonas sp.</i> TY10	1	$1,8 \times 10^9$	$3,34 \times 10^9$	85,6
	2	$3,62 \times 10^9$	$4,64 \times 10^9$	28,2
	7	$2,1 \times 10^9$	$2,7 \times 10^9$	28,6
<i>Rhodococcus sp.</i>	1	$2,2 \times 10^9$	$4,0 \times 10^9$	81,8
	2	$3,1 \times 10^9$	$3,9 \times 10^9$	25,8
	7	$2,1 \times 10^9$	$2,0 \times 10^9$	-4,8

2. Концентрация биомассы в процессе культивирования микроорганизмов на различных углеводородных субстратах, кл/мл

Микроорганизм	Продолжительность культивирования, сут.	Субстрат	
		дизельное топливо	моторное масло
<i>Bacillus sp.</i> TY22	1	$3,9 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$
	2	$4,2 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$
	6	$4,1 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$
	7	$4,0 \times 10^6$	—
	8	$3,8 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$
<i>Rhodococcus sp.</i>	1	$2,2 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$
	2	$2,3 \times 10^6$	$4,2 \times 10^7$
	6	$1,0 \times 10^6$	$2,6 \times 10^7$
	7	$1,0 \times 10^6$	—
	8	$1,0 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$
<i>Pseudomonas sp.</i> TY10	1	$6,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^7$
	2	$1,8 \times 10^9$	$2,5 \times 10^7$
	6	$4,5 \times 10^8$	$2,1 \times 10^7$
	7	$2,3 \times 10^8$	—
	8	$1,8 \times 10^8$	$1,2 \times 10^7$

Обозначения (—) — исследования не проводились

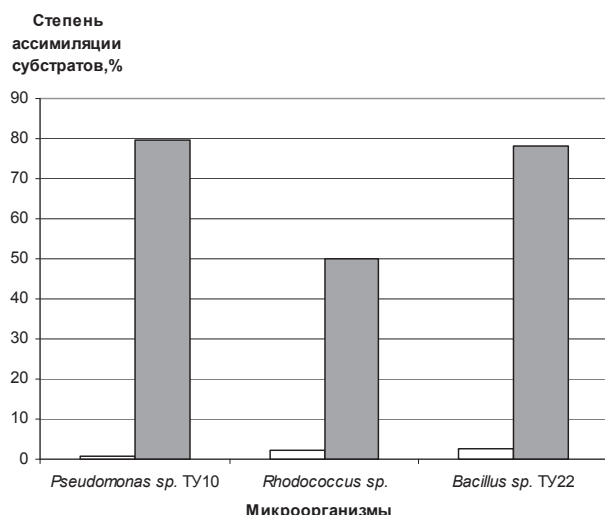


Рис. 1 – Ассимиляция микроорганизмами углеводородных субстратов:

- – ассимиляция дизельного топлива,
 ■ – ассимиляция моторного масла

точные биоэмульгаторы. Причём одновременное внесение с микроорганизмами биологических поверхностно-активных веществ (биоПАВ) способствует не только эмульгированию и ускорению деструкции нефтяных углеводородов, но и увеличивает биодоступность источника углерода для микроорганизмов [4, 7]. В настоящей работе исследовано влияние синтетических ПАВ на рост и деструктирующую активность углеводородокисляющих микроорганизмов.

Оказалось, добавление в синтетическую углеводородную среду детергентов приводило к увеличению концентрации бактериальных суспензий по сравнению со средой контрольной (рис. 2). Особенно это заметно было через 24–48 час. с момента посева бактерий, когда увеличение биомассы родококков и псевдомонад приближалось, а бацилл двукратно превышало соответствующие показатели для контрольной среды. Последующее культивирование бактерий до 7 сут. не приводило к росту бактерий, а в отдельных случаях (*Rhodococcus sp.*) концентрация клеток заметно снижалась, хотя оста-

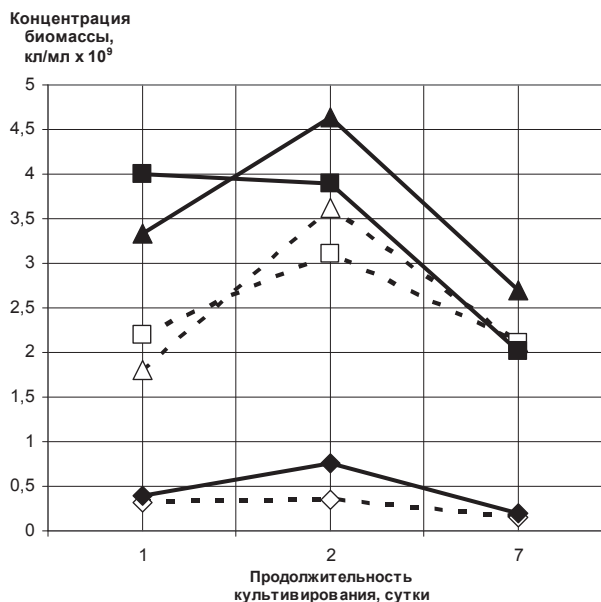


Рис. 2 – Влияние диспергирующих веществ на рост микроорганизмов в синтетической среде на основе нефти:

- ▲ – рост *Pseudomonas sp. TY10* в среде с ДСН;
 △ – рост *Pseudomonas sp. TY10* в контрольной среде;
 ■ – рост *Rhodococcus sp.* в среде с третон X-100;
 □ – рост *Rhodococcus sp.* в контрольной среде;
 ◆ – рост *Bacillus sp. TY22* в среде с твином 80;
 ◇ – рост *Bacillus sp. TY22* в контрольной среде

валась более чем на порядок выше посевной дозы.

Добавление ПАВ в почву положительно сказывалось на деструкции нефти всеми исследуемыми микроорганизмами (табл. 3).

Интенсивность ассимиляции субстратов в почвах, содержащих детергенты, увеличивалась от 22 до 81%. Очистка почвенных образцов штаммом *Pseudomonas sp. TY10* при добавлении ДСН увеличивалась в 1,2 раза, деструктивная активность *Bacillus sp. TY22* в присутствии твина-80 возрастала в 1,4 раза, а в образцах почв с третон X-100 степень очистки *Rhodococcus sp.* в 1,8 раза превышала контрольные показатели. Из исследуемых микроорганизмов родококк проявлял наименьшую углеводородокисляющую активность, и степень

3. Ассимиляция микроорганизмами нефти в различных почвах

Микроорганизм	Концентрация нефти, %									
	почва									
	чернозёмная					песчаная				
	контрольные образцы		с ПАВ		кратность превышения	контрольные образцы		с ПАВ		кратность превышения
	конечная	степень очистки, %	конечная	степень очистки, %		конечная	степень очистки, %	конечная	степень очистки, %	
<i>Bacillus sp. TY22</i>	2,12	57,6	1,1	78	1,35	2,04	59,2	0,8	84	1,42
<i>Pseudomonas sp. TY10</i>	1,75	65	0,4	92	1,42	1,1	78	0,23	95,4	1,22
<i>Rhodococcus sp.</i>	3,1	38	1,6	68	1,79	2,84	43,2	1,1	78	1,81

очистки почвенных образцов составляла от 38–68% в чернозёмной до 43–78% в песчаной почвах. Наиболее высокая эффективность деструкции углеводов установлена для *Pseudomonas sp.* ТУ10, показатели которой превышали 90%. Степень очистки от нефти песчаной почвы оказалась выше, чем чернозёмной.

Вывод. Таким образом, исследуемые микроорганизмы оказались способными расти на всех испытанных углеводородных субстратах. Бактерии оказались малоэффективными деструкторами дизельного топлива, однако каждый из них в короткие сроки проявлял высокую деструктивную активность в отношении моторного масла и сырой нефти. Добавление ПАВ оказывало стимулирующее действие на рост нефтеокисляющих бактерий и положительно сказывалось на деструкции нефти в почвенных образцах. Степень очистки почвенных образцов штаммами *Pseudomonas sp.* ТУ10, *Bacillus sp.* ТУ22 и *Rhodococcus sp.* в присутствии детергентов существенно возрастала. Наиболее

высокая степень деструкции нефти установлена для штамма *Pseudomonas sp.* ТУ10.

Литература

1. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзев Г.И. Практикум по микробиологии. М.: Колос, 1979. 216 с.
2. Ермоленко З.М., Чугунов В.А., Герасименко В.Н. Влияние некоторых факторов окружающей среды на выживаемость внесённых бактерий, разрушающих нефтяные углеводороды // Биотехнология. 1997. № 5. С. 33–38.
3. Биопрепарат «Охромин». Новые технологии в решении экологических проблем ТЭК: матер. II Междунар. науч.-практич. конф., 7–8 февраля 2007 г. 2007. URL: http://www.newchemistry.ru/letter.php?n_id=356 (Дата обращения 10.12.2013 г.).
4. Волченко Н.Н., Карасева Э.В. Скрининг углеводородокисляющих бактерий-продуцентов поверхностно-активных веществ биологической природы и их применение в опыте по ремедиации нефтезагрязнённой почвы и нефтешлама // Биотехнология. 2006. № 2. С. 57–62.
5. Singh A. Advances in Applied Bioremediation (Soil Biology) Volume 17 / A. Singh, R.C. Kuhad, O.P. Ward. London, New York, Heidelberg: Springer Dordrecht, 2009. 361 p.
6. Van Hamme, J. Recent advances in petroleum microbiology / J. Van Hamme, A. Singh, O.P. Ward // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. Vol. 10, N 67. P. 503–549.
7. Plaza G. Relation between soil microbial diversity and bioremediation process at an oil refinery / Grazyna Plaza, Krystof Ultig, Robin L. Brigmon // Acta microbial. Pol. 2005. Vol. 52, № 2. P. 173–182.