

Карамышева Наталья Николаевна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник
Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

Бутовичева Анна Александровна

бакалавр, студентка

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

лаборант-исследователь

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

РАЗРАБОТКА И АПРОБИРОВАНИЕ МОДЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНОГО КОНСОРЦИУМА БАКТЕРИЙ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ IN VITRO

Аннотация: в статье отражен один из методов создания консорциумов бактерий-нефтедеструкторов, в который вошли штаммы бактерий видов *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Alcaligenes sp.* и образцы загрязненных мазутом почв с мест добычи нефти на территории пяти районов Ульяновской области. Проведены сравнительные исследования консорциума бактерий-нефтедеструкторов, способных развиваться при пониженных температурах, с определением действия бактерий-

деструкторов на компоненты нефти и ее производных различных фракций [3, с. 509–512].

Ключевые слова: нефтедеструктор, консорциум, штамм, биопрепарат.

Загрязнение окружающей среды вследствие антропогенного воздействия человека в настоящее время приобретает все большие размеры. Особое место занимает загрязнение почв нефтью и нефтепродуктами, которое носит комплексный характер и в первую очередь оказывает влияние на структуру почвенного микробиоценоза.

Нефть и нефтепродукты попадают в окружающую среду вследствие разлива и таким образом наносят ощутимый экологический вред экологии. Для борьбы с этой проблемой существует целый комплекс методов: боны, рекультивация почвы, сорбенты. Всё чаще при ликвидации разливов нефти используют биопрепараты на основе бактериальных консорциумов, в частности, бактерий-нефтедеструкторов [2, с. 413–418].

Консорциум бактерий-нефтедеструкторов способен к переработке и окислению широкого спектра углеводородов нефти: алканов, алкенов и различных полиароматических соединений, поэтому служит основой для создания биопрепаратов.

Цель нашего исследования – разработка и апробация модели бактериального консорциума бактерий-нефтедеструкторов *in vitro*, состоящей из штаммов бактерий-деструкторов, выделенных из образцов почвы, загрязненной мазутом.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись образующие природный почвенный консорциум бактерии микробиоценоза способные к окислению нефти и нефтепродуктов. Бактерии были выделены из почвы, загрязненной дизельным топливом с месторождений нефти Ульяновской области (табл. 1).

Таблица 1

Месторождения нефти Ульяновской области

<i>Название месторождения</i>	<i>Количество месторождений</i>	<i>Тип нефти</i>
Новоспасский р-он	4	Тяжелая фракция
Николаевский р-он	3	Высокосернистая фракция
Радищевский р-он	1	Средняя фракция
Старокулаткинский р-он	1	Средняя фракция
Ульяновский р-он	1	Средняя фракция

Методом газовой хроматографии на оборудовании TRACE 1300/1310 (Москва, Россия) проводилась оценка хлороформного экстракта нефти с мест нефтедобычи. Данный метод использовался в качестве оценки эффективности работы модели консорциума деструкторов.

Микроорганизмы выделяли из образцов, загрязненных мазутом почвы методом накопительных культур на агаризованной среде Раймонда/среда №7 (Raymond, 1961). Для культивирования микроорганизмов методом накопительных культур 1 г почвы помещали в колбы (объем 250 мл) с 100 мл жидкой минеральной среды Раймонда (г/л): Na_2CO_3 – 0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,02; CaCl_2 – 0,01; $\text{MnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,02; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ – 1,0; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ – 1,5; NH_4Cl – 3.

В качестве источника питания вносили углеводороды нефти в количестве 0,1% (по объему). Культивирование проводили в статических условиях при температуре 28°C в течение 3 суток при периодическом встряхивании на термощейкере (Shaking Incubator «Lab Tech», Италия).

Бактериальные штаммы выделяли из накопительных культур с дальнейшим культивированием в чашках Петри при температуре 28 °С на агаризованной минеральной среде Раймонда без пептона, на поверхность которой наносили углеводородный субстрат – 100 мкл стерильной нефти.

Изолирование выращенных колоний микроорганизмов проводили по морфолого-физиологическим признакам с дальнейшей идентификацией штаммов микроорганизмов на масс-спектрометре MALDI-TOF (Bruker Daltonics, США). По толщине нефтяной пленки отбирали штаммы, которые более активно пере-

рабатывали углеводороды нефти и соответственно являются нефтеструктурами.

Отобранные штаммы деструкторы высевали в чашки Петри на агаризованной среде Раймонда/среда №7 и культивировали 3 суток. В дальнейшем часть чистых культуры деструкторов была использована в дальнейшем исследовании, а другая часть использовалась для формирования музея микробиологических культур.

Чистые культуры выделенных штаммов деструкторов были использованы для создания консорциума. Для этого штаммы культивировали на жидкой среде Раймонда/среда №7 в течение 3 суток.

Результаты и их обсуждение

В ходе проведенной работы из исследованных образцов методом время пролетной масс-спектрометрии накопительных культур было выделено 10 бактериальных штамма, способных в разной степени использовать углеводороды нефти в качестве источника питания (табл. 2).

Таблица 2

Штаммы микробиоценоза с образцов почв загрязненных мазутов с месторождений Ульяновской области

№ пп	Наименование штамма микроорганизмов	Деструкторы
1	<i>Pseudomonas putida</i>	+
2	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	+
3	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	+
4	<i>Alcaligenes spp.</i>	+
5	<i>Mycobacterium spp.</i>	-
6	<i>Norcadia spp.</i>	-
7	<i>Gordonia spp.</i>	-
8	<i>Anthrobacter sp.</i>	-
9	<i>Bacillus megaterium</i>	-
10	<i>Bacillus subtilis</i>	-

Для изучения деструктивной способности культивированных штаммов микробных ассоциаций в лабораторных условиях в сосуды объемом 1 литр поместили по 500 г почвы, загрязненной мазутом. Титр углеводородокисляющей микрофлоры составил КОЕ 10^{10} кл/мл. Культуральную жидкость на шейкере при $+28^{\circ}\text{C}$ нарабатывали в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, длительность ферментации составила 3 суток. Контроль концентрации углеводов в почве осуществляли методом ИК-спектрофотометрии на приборе АН-2 (Анализатор АН-2, Германия). Оценка динамики снижения концентрации углеводов выявила 4 группы штаммов деструкторов углеводороды нефти (табл. 2, рис. 3).

По результатам анализа результатов газовой хроматографии (рис. 1) на содержание хлороформного экстракта нефти без добавления деструкторов (а) и после биодеструкции ассоциацией штаммов бактерий (б) проведена оценка эффективности разработанного консорциума. Инкубирование проводили в течение 3 суток, при температуре 12°C и рН 7,0. Полученный результат представлен на рисунке 2.

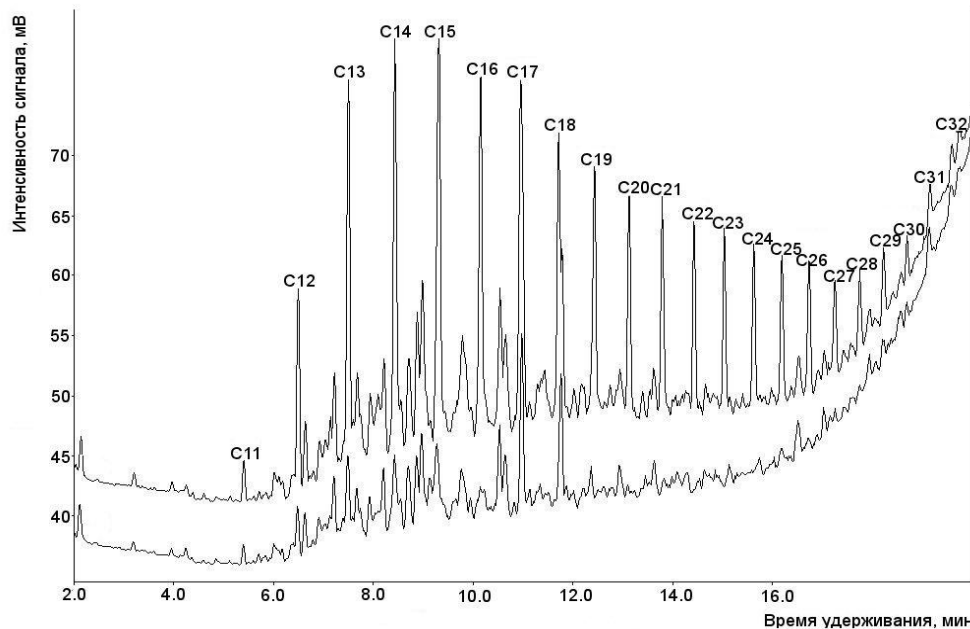
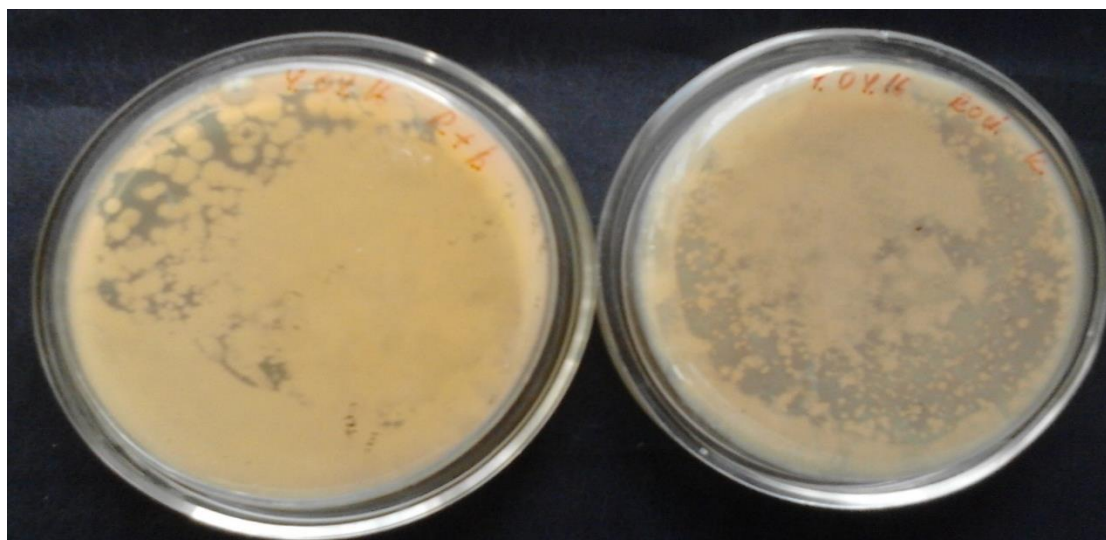


Рис. 1. Газовая хроматограмма хлороформного экстракта нефти без добавления деструкторов (а) и после биодеструкции ассоциацией штаммов бактерий (б) в течение 3 суток инкубирования при температуре 12°C и рН 7,0



Рис. 2. Имитация нефтяного разлива с добавлением нефтедеструкторов: (слева направо) 1 – контроль, 2, 3 – с добавлением ассоциации бактерий, 4 – после биодеструкции ассоциацией штаммов бактерий в течение 3 суток инкубирования при температуре 12°C и pH 7,0

Из полученных результатов следует, что через 3 суток культивирования разработанного консорциума (*Pseudomonas putida*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Alcaligenes sp.*) содержание мазута в жидкой среде Раймонда/среда №7 уменьшается на 40–50%. Результаты данного эксперимента отражают, что отобранные бактериальные штаммы совместимы в ассоциации, утилизирующей нефтепродукты (мазут) и обладают высокой эффективностью в отношении трудно окисляемых тяжелых фракций углеводородов мазута.



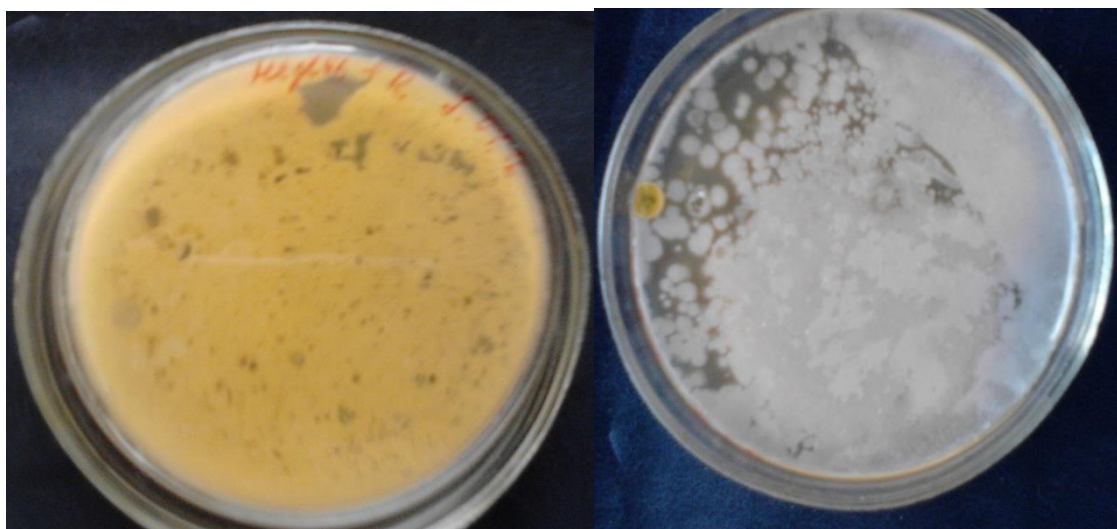


Рис. 3. Слева направо: 1 – среда с нефтью до биодеструкции; 2 – среда после биодеструкции бактериями рода *Rhodococcus rhodochrous* в течение 3 суток культивирования при температуре 12°C и pH 7,0

В результате проведенного исследования был разработан и апробирован биоконсорциум, состоящий из штаммов бактерий-нефтедеструкторов – *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Alcaligenes sp.* Микроорганизмы, входящие в состав выделенного нами консорциума, способны утилизировать широкий спектр компонентов нефти разных фракций.

Список литературы

1. Барышникова Л.М. Биодegradация нефтепродуктов штаммами-деструкторами и их ассоциациями в жидкой среде / Л.М. Барышникова, В.Г. Грищенко, М.У. Аринбасаров, А.Н. Шкидченко, А.М. Боронин // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т. 37, №5. – С. 542–548.
2. Кобзев Е.Н. Исследование устойчивости ассоциации микроорганизмов-нефтедеструкторов в открытой системе / Е.Н. Кобзев, С.Б. Петрикевич, А.Н. Шкидченко // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т. 37, №4. – С. 413–418.

3. Шкидченко А.Н. Изучение нефтеструктивной активности микрофлоры прибрежной зоны Каспийского моря / А.Н. Шкидченко, М.У. Аринбасаров // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т. 38, №5. – С. 509–512.

4. Стабникова Е.В. Выбор активного микроорганизма-деструктора углеводов для очистки нефтезагрязненных почв / Е.В. Стабникова, М.В. Селезнева, О.Н. Рева, В.Н. Иванов // Прикладная биохимия и микробиология. – 1995. – Т. 31, №5. – С. 534–539.

5. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхард [и др.]. – М., 1983.

6. Рогозина Е.А. Сравнительная характеристика отечественных биопрепаратов, предлагаемых для очистки почв и грунтов от загрязнения нефтью и нефтепродуктами / Е.А. Рогозина, О.А. Андреева, С.И. Жаркова [и др.] // Нефтегазовая геология. Теория и практика. – 2010. – Т. 5, №3 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www/ngtp.ru/rub/7/37_2010/pdf

7. La Montagne M.G., Schimel J.P., Holden P.A. Comparison of subsurface and surface soil bacterial communities in California grassland as assessed by terminal restriction length polymorphisms of PCR-amplified 16S rRNA genes/ *Microb. Ecol.* – 2003. – N 46. – P. 216–227.

8. Kauffmann I.M., Schmitt J., Schmid R.D. DNA isolation from soil samples for cloning in different hosts // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 64. – P. 665–670.

9. Новые технологии производства и применения биопрепаратов комплексного действия / под ред. А.А. Завалина, А.П. Кожемякова. – СПб.: Химиздат, 2010. – 64 с.