

ИЗУЧЕНИЕ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ СВОЙСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ КОЛЬСКОГО СЕВЕРА

STUDY OF HYDROCARBON-OXIDIZING PROPERTIES OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM AQUATIC ECOSYSTEMS OF THE KOLA NORTH

**M. Litvinova
E. Kozhukhova
E. Makarevich
A. Garbul**

Summary. For the first time three isolates of hydrocarbon-oxidizing microorganisms of *Pseudomonas lundensis*, *Aeromonas eucrenophyla*, *Pseudomonas fragi* were isolated from the oil-contaminated waters of the Kola North. The aim of this work was to study the hydrocarbon-oxidizing activity of the indigenous strains and the possibility of using those as a basis for a biopreparation for water purification after hydrocarbon pollution. The paper evaluates the efficiency of oil and diesel fuel degradation by fluorometric method, as well as the bio-emulsifying and hydrophobic activities of monocultures and the association of hydrocarbon-oxidizing microorganisms. The dynamics of bacterial growth was studied at different temperatures of cultivation based on the increase in optical density in a mineral medium with diesel fuel. Moreover, the absence of antagonistic activity was noted when composing the monocultures of oil-degrading bacteria into associations. The ability of the studied strains of microorganisms to grow on various hydrocarbon substrates was also shown. Based on the obtained results, it can be concluded that the bacterial strains are promising for biodegradation of hydrocarbons and can be used in bioremediation of environmental pollution.

Keywords: hydrocarbon-oxidizing bacteria, water, oil pollution, microbial consortium, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp.

Литвинова Марина Юрьевна

кандидат биологических наук, доцент,
Мурманский арктический университет
litvinovamyu@mauniver.ru

Кожухова Екатерина Вячеславовна

старший преподаватель,
Мурманский арктический университет
kozkhukhovaev@mauniver.ru

Макаревич Елена Викторовна

кандидат биологических наук,
Мурманский арктический университет
makarevichev@mauniver.ru

Гарбуль Анна Викторовна

кандидат биологических наук, доцент,
Мурманский арктический университет
garbulav@mauniver.ru

Аннотация. Из вод Кольского Севера выделено три изолята углеводородоокисляющих микроорганизмов *Pseudomonas lundensis*, *Aeromonas eucrenophyla*, *Pseudomonas fragi*. В работе дана оценка эффективности деградации нефти и дизельного топлива монокультурами и консорциумом исследуемых микроорганизмов флуориметрическим методом, а также биоэмульгирующей и гидрофобной активностей. Изучена динамика роста бактерий, при различных температурах культивирования по показателю прироста оптической плотности в минеральной среде с дизельным топливом. По результатам исследования можно сказать, что изученные штаммы обладают свойствами биодеструкторов нефтяных углеводородов и могут быть использованы в экобиотехнологиях.

Ключевые слова: углеводородоокисляющие бактерии, вода, нефтяное загрязнение, консорциум микроорганизмов, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp.

Введение

Серьезной экологической проблемой в современном мире является загрязнение углеводородами. Загрязнение нефтью и нефтепродуктами происходит в результате смыва нефтесодержащих стоков предприятий и ливневых вод, с промышленных площадок, городских улиц. Случайные нефтяные разливы также являются источником нефтяного загрязнения [7].

На сегодняшний день существует ряд технологий, которые позволяют очистить объекты окружающей среды от загрязнения углеводородами. Существует мно-

жество способов и методов борьбы с загрязнениями нефтепродуктами. Химические и механические методы имеют ограниченную эффективность и могут быть дорогостоящими [7]. Аварии судов приводят к разливам топлива, убрать которые с поверхности воды не так просто. Обычная процедура очистки предусматривает локализацию пятна, а затем сбор нефтяной пленки с поверхности воды с помощью заграждений. Но эти технологии не совершенны. Это не означает, что нефть сквозь заграждения не попадет в воду и потом очень трудно механически собрать небольшое количество нефти. Так что на поверхности неизбежно остается тонкая пленка. Ликвидировать последствия утечки нефти — тяжелый

труд, и тут на помощь приходят микроорганизмы. Водные экосистемы способны к самоочищению благодаря населяющим их микроорганизмам. Бактерии обладают удивительным свойством перерабатывать отходы. Они в прямом смысле слова съедают нефтяные пятна. С помощью особых ферментов они окисляют углеводороды до углерода и воды. Тот факт, что углеводороды могут быть использованы в качестве субстрата живыми организмами, обычно рассматривается как уникальная черта, а выделение микроорганизмов-деструкторов часто рассматривается как уникальная находка. Поскольку применение микроорганизмов в процессах биоремедиации является естественным следствием того, что они используют углеводороды в качестве источника энергии [6].

Часть нашей страны располагается в Арктическом и Субарктическом поясах, поэтому и бактерии нужны специфические — холодолюбивые. Все микробные процессы при пониженных положительных температурах замедляются, и для разложения нефтяных пятен в холодных водах, конечно, нужны психрофильные бактерии, способные разлагать углеводороды нефти [1]. Для очистки нефтезагрязненных местообитаний надо использовать не один вид, а несколько видов, их сочетания. Поэтому важным моментом является выделение и идентификация аборигенных психрофильных бактерий, которые способны деградировать нефтепродукты при температуре ниже 10°C. Невозможно остановить загрязнение окружающей среды нефтепродуктами, поэтому особенно остро стоит решение данного экологического вопроса. Хорошо зарекомендовал себя метод использования аборигенных микроорганизмов, выделенных из загрязненных местообитаний. Вследствие этого, исследования, направленные на выделение и отбор наиболее активных микроорганизмов, окисляющих нефтяные углеводороды, способных использовать их, особенно актуальны.

Цель и задачи исследования

Цель работы состояла в исследовании углеводородокисляющих свойств аборигенных штаммов бактерий *Pseudomonas lundensis* (Molin, et al. Molin et al. 1986); *Aeromonas eucrenophyla* (Schubert and Hegazi, 1988); *Pseudomonas fragi* (Eichholz 1902, Gruber 1905), выделенных из загрязненных местообитаний Кольского Заполярья и возможности их использования в виде биопрепарата в экобиотехнологиях.

Для реализации поставленной цели определены следующие задачи:

- при формировании микробного консорциума определить отсутствие антагонистической активности и динамику роста микроорганизмов по увеличению оптической плотности в среде с дизельным топливом;

- оценить эффективность деградации нефтепродуктов монокультурами и ассоциацией углеводородокисляющих микроорганизмов флуориметрическим методом;
- провести оценку биоэмульгирующей и гидрофобной активностей исследуемых культур и консорциума микроорганизмов.

Методы исследования

Выделение и идентификацию углеводородокисляющих бактерий проводили на основании культуральных, морфологических, тинкториальных и физиолого-биохимических свойств с использованием жидкой минеральной модифицированной среды ММС с дизельным топливом [10]. Выделение микроорганизмов проводили при температуре 4 ± 2 °C. Из водотоков и активного ила города Мурманска выделены штаммы микроорганизмов и идентифицированы аналитическим методом масс-спектрометрии как *Pseudomonas lundensis*, *Aeromonas eucrenophyla* и *Pseudomonas fragi*.

При снижении температуры окружающей среды происходит снижение метаболической активности у микроорганизмов и потому в работе приведены данные углеводородокисляющих свойств одних и тех же штаммов микроорганизмов, но при двух температурах: 4 ± 2 °C и 20 ± 2 °C. Массовую концентрацию нефтепродуктов определяли флуориметрически на приборе «Флюорат-02», согласно ПНД Ф 14.1:2.4.128-98. Культивирование осуществляли 25 дней на минеральной среде ММС с 1% нефтяного углеводорода [10] (нефть — месторождение Баренцево море и дизельное топливо марки «летнее»).

Индекс эмульгирования определяли, как описано в работе [9]. Гидрофобную активность измеряли по методу Rosenberg M. и в модификации Серебряковой [11].

Метод перпендикулярных штрихов использовали для определения антагонистической активности отобранных штаммов бактерий. Микроорганизмы (предполагаемый антагонист и проверяемые микроорганизмы), вносили на плотную питательную среду методом перпендикулярных штрихов и проводили измерение расстояния от одной культуры до другой [4].

Оптическую плотность суспензии бактерий определяли нефелометрически на спектрофотометре. Культивирование проводили при температурах 4 ± 2 °C и 20 ± 2 °C в течение 14–24 дней на жидкой минеральной среде ММС с 1 % дизельного топлива. Время культивирования зависело от индивидуальной скорости роста микроорганизмов. Увеличение численности бактерий во флаконах оценивали по величине оптической плотности при длине волны $\lambda = 540$ нм и толщине оптического слоя 10 мм.

Результаты и их обсуждение

Микроорганизмы в естественной среде обитания живут друг с другом в определенных взаимоотношениях. Необходимым условием для разработки высокоэффективной ассоциации микроорганизмов, окисляющих углеводороды, является отсутствие антагонистических отношений между микробными культурами. Причинами возникновения антагонизма являются: нехватка питательных веществ, изменения pH среды, образование протеолитических ферментов, антибиотиков и химических веществ [4]. Одним из недостатков использования монокультур является снижение деструкции нефтепродуктов. Если использовать консорциумы микроорганизмов можно повысить эффективность деструкции углеводородов, загрязняющих окружающую среду.

У созданного в работе консорциума микроорганизмов не обнаружено антагонистического влияния на рост и развитие друг друга и поэтому мы использовали его в дальнейшей работе. Итак, исследования проводились с тремя чистыми монокультурами и консорциумом микроорганизмов *Pseudomonas lundensis* + *Aeromonas eucrenophyla* + *Pseudomonas fragi*.

Изучение темпов роста бактериальных штаммов в жидкой минеральной среде ММС с дизельным топливом при температурах $4\pm 2^\circ\text{C}$ и $20\pm 2^\circ\text{C}$ (рис. 1 и 2). Чтобы оценить данное свойство культур измеряли показатель прироста оптической плотности. Консорциум и монокультуры имели положительную динамику роста в течение всего хода эксперимента при выбранных температурах культивирования. Полученные результаты дают

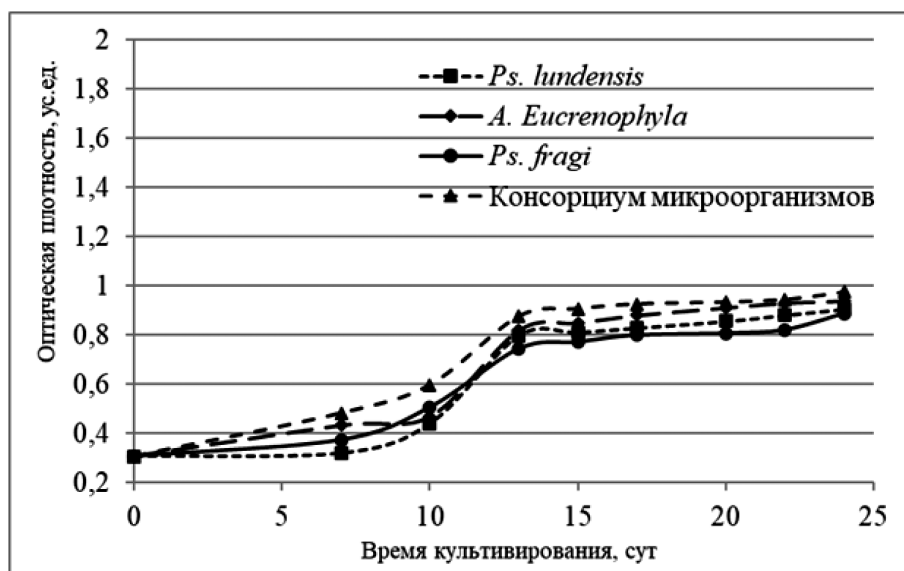


Рис. 1. Динамика роста микроорганизмов на среде ММС с дизельным топливом при температуре $4\pm 2^\circ\text{C}$

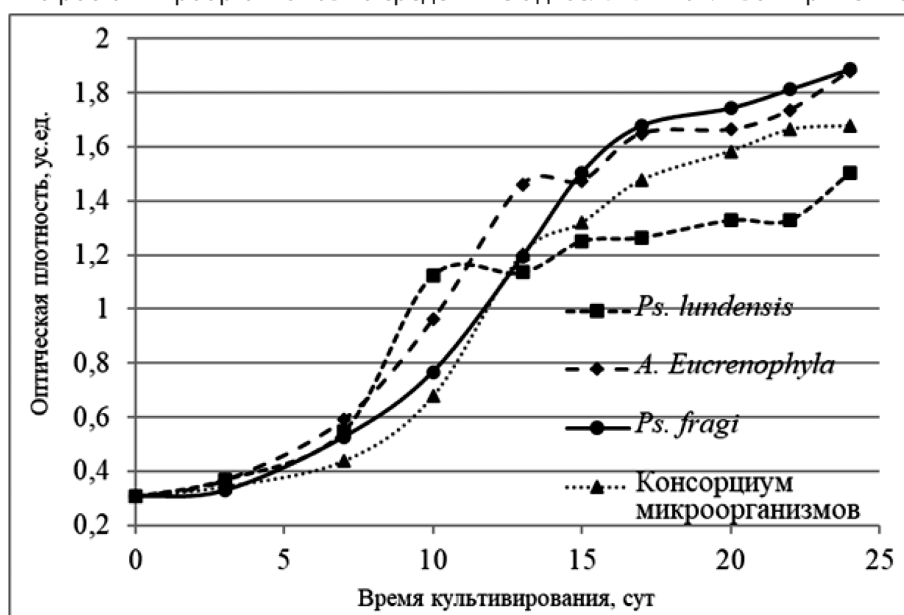


Рис. 2. Динамика роста микроорганизмов на среде ММС с дизельным топливом при температуре $20\pm 2^\circ\text{C}$

возможность предположить, что выделенные бактерии являются психротрофными организмами. Можно заметить, что при выбранных температурах инкубации исследуемые микроорганизмы и консорциум адаптировались к условиям среды за 5 суток при $20\pm 2^\circ\text{C}$ и 10 суток при $4\pm 2^\circ\text{C}$.

Наибольший прирост оптической плотности в среде культивирования наблюдался у *Pseudomonas fragi* при $20\pm 2^\circ\text{C}$. Оптическая плотность выросла в 6 раз по сравнению с начальным значением. Оптическая плотность консорциума к 24 суткам культивирования при $4\pm 2^\circ\text{C}$ и $20\pm 2^\circ\text{C}$ выросла в 3 и 5 раз от начального значения соответственно. Наименьшими значениями характеризовался штамм *Pseudomonas lundensis*.

Деградацию дизельного топлива и нефти оценивали в условиях культивирования $4\pm 2^\circ\text{C}$ и $20\pm 2^\circ\text{C}$ в жидкой среде при добавлении нефтепродукта в количестве 1 % от общего объема. Согласно полученным данным (рис. 3), все исследуемые микроорганизмы способны к деструкции дизельного топлива и в меньшей степени к деструкции нефти.

В процессе проведения эксперимента определено, что более интенсивными деструкторами дизельного топлива из числа исследуемых оказались штамм *A. eucrenophyla*, утилизовавший 98 % углеводорода, а также *Ps. fragi*, степень деструкции для которого достигала 82 %. Наименее активным деструктором оказался штамм *Ps. lundensis*, показав результат 67 %. Хотелось отметить, что полученные нами количественные данные относительно деструкции дизельного топлива

монокультурами и ассоциацией углеводородокисляющих микроорганизмов являются, скорее всего, максимально возможными, так как соединения этого класса сравнительно легко используются микроорганизмами [8]. Деструкция нефти намного ниже и составляет от 8 % до 27 % при $4\pm 2^\circ\text{C}$ культивирования и 13–30 % при $20\pm 2^\circ\text{C}$. В результате установлено, что все исследуемые культуры микроорганизмов способны к деструкции нефтепродуктов, а значит, могут быть использованы для создания биопрепарата.

Известно, что микроорганизмы обладают способностью к производству поверхностно-активных веществ (ПАВ) и с этим процессом сопряжена их углеводородокисляющая активность. Это позволяет повышать общедоступность нефтяных углеводородов для бактерий [2]. Синтез поверхностно-активных веществ у бактерий оценивали по индексу эмульгирования, который базируется на свойстве образовывать эмульсию при взаимодействии культуры микроорганизмов с углеводородом [3].

В ходе эксперимента установлено, что температура не оказывает какого-либо существенного влияния на производство бактериальной клеткой биоПАВ. Значения эмульгирующей активности у трех монокультур и консорциума варьируют от 44 до 50 % при обеих температурах (рис. 4). Согласно данным литературы перспективными продуцентами ПАВ являются микроорганизмы, у которых индекс эмульгирования выше 50 % [2]. Из вышесказанного следует, что штамм *Ps. lundensis* является активным продуцентом биоПАВ.

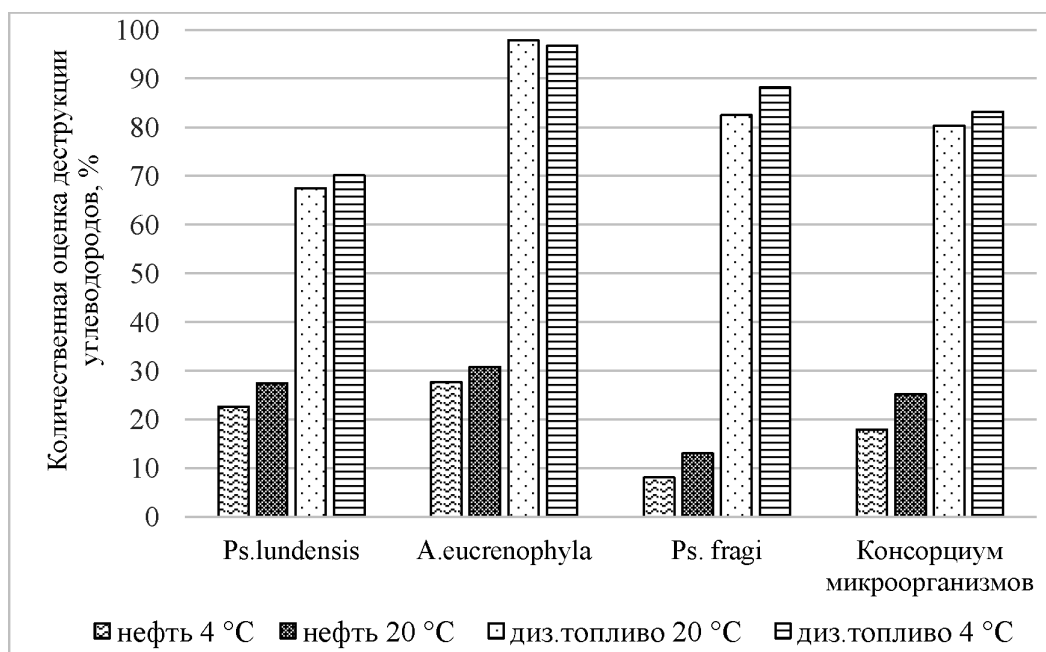


Рис. 3. Количественная оценка деструкции углеводородов (нефть и дизельное топливо) чистыми культурами микроорганизмов и консорциумом при $4\pm 2^\circ\text{C}$ и $20\pm 2^\circ\text{C}$

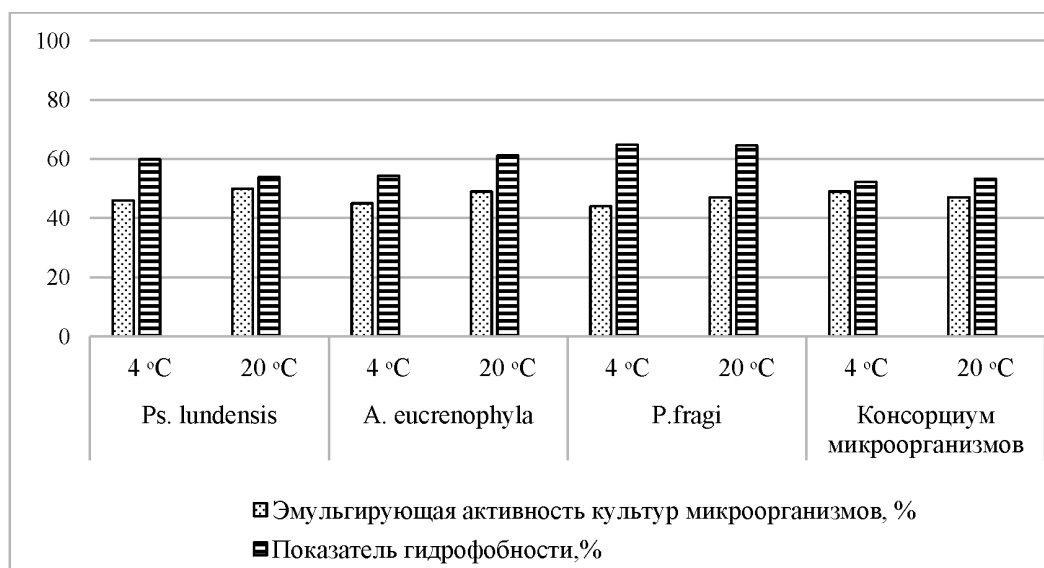


Рис. 4. Показатели эмульгирования и гидрофобности у монокультур и консорциума микроорганизмов при температурах $4\pm 2^\circ\text{C}$ и $20\pm 2^\circ\text{C}$

Определение степени гидрофобности клеток микроорганизмов является еще одним важным свойством для оценки эмульгирующих свойств, т.е. критерием отбора микроорганизмов, способных к синтезу биоПАВ, не выделяющихся в водную среду. Гидрофобность клеток культуры *A. eucrenophyla* выше при 20°C , а для штамма *Ps. lundensis* при $4\pm 2^\circ\text{C}$. У культуры *Ps. fragi* наблюдается максимальная гидрофобность при $4\pm 2^\circ\text{C}$ и $20\pm 2^\circ\text{C}$, а именно 65 % и 64 % (рис. 4), соответственно.

Для консорциума гидрофобность клеток примерно одинакова при $4\pm 2^\circ\text{C}$ и $20\pm 2^\circ\text{C}$, а именно — 52 % и 53 % соответственно. В таком случае температура не оказывает какого-либо влияния на величину синтеза биоПАВ. Бактерии отбирают как продуценты биоПАВ при значениях показателя гидрофобности более 20 % [5] и этим требованиям соответствует штамм *Ps. lundensis*.

Синтез бактериями-деструкторами биоПАВ является главной составляющей биodeградации нефти в воде, так как она по своему составу и свойствам почти нерастворима в ней [12]. Создавая тонкодисперсную эмульсию, бактерии способствуют коллоидному растворению нефтяных углеводородов. Кроме всего прочего, они измельчают углеводороды, тем самым облегчают их усвоение для других нефтедеструкторов.

Заключение

Процесс микробной деградации способствует удалению углеводородов из окружающей среды. Это возможно, потому что у микроорганизмов есть ферментные системы для разложения и использования различных углеводородов в качестве источника углерода и энергии.

В результате исследования из загрязненных углеводородами проб воды и активного ила выделены три активных изолята углеводородокисляющих микроорганизмов *Pseudomonas lundensis*, *Pseudomonas fragi* и *Aeromonas eucrenophyla*. Бактерии выделенных штаммов являются постоянными обитателями естественных северных биоценозов, это позволяет не учитывать климатические условия данного региона.

Эксперименты по деструкции углеводородов дизельного топлива при $4\pm 2^\circ\text{C}$, показали, что исследуемые микробные сообщества обладают высокой деструктивной активностью от 70 до 96 %. Следует отметить, что полученные результаты сопоставимы с опубликованными нами ранее данными. Эффективность процесса очистки модельных питательных сред от дизельного топлива этими же культурами составила от 40 до 98 % и зависела от состава модельной среды [13].

Монокультуры микроорганизмов *Ps. lundensis*, *A. eucrenophyla*, *Ps. fragi* использованы нами для создания ассоциации на их основе, в виду отсутствия антагонистического влияния друг на друга. Микроорганизмы-деструкторы и консорциум способны к росту на среде, содержащей в качестве единственного источника углерода дизельное топливо. Кроме этого, они характеризуются высокими потенциалами эмульгирующей и гидрофобной активностей. Индекс эмульгирования монокультур и ассоциации микроорганизмов варьирует в диапазоне значений от 40 % до 50 %, а показатели гидрофобности изолятов бактерий составляет более 50 %. Степень деструкции нефти снижается в три — десять раз.

Выделенные бактерии родов *Pseudomonas* и *Aeromonas* относятся к аборигенным представителям

водной микробиоты Кольского Севера и обладают значительными углеводородокисляющими свойствами. Исследуемые монокультуры и ассоциация углеводородокисляющих микроорганизмов обладают функцио-

нальным комплексом промышленно значимых свойств и могут стать основой биопрепарата для биоремедиации нефтезагрязненных акваторий Кольского Севера.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ананько Г.Г. и др. Устойчивость нефтеокисляющих микроорганизмов к низким температурам // Биотехнология. — 2005. — № 5. — С. 63–69.
2. Бектурова А.Ж. и др. Эмульгирующая активность некоторых углеводородокисляющих микроорганизмов // Вестник КазНУ. — Серия биологическая. — 2013. — № 3/1 (59) — С. 56–58.
3. Волченко Н.Н. Влияние условий культивирования на поверхностно-активные свойства углеводородокисляющих актинобактерий: дис. ... канд. биол. наук. — Ставрополь, 2006.
4. Гончарова А.В. и др. Изучение углеводородокисляющего потенциала ассоциаций бактерий Каспийского региона для создания препаратов для биоремедиации // Вестник КазНУ. Серия биологическая. — 2017. — № 4 (73). — С. 126–140.
5. Демаков В.А. и др. Гидрофобные свойства и пленкообразующая способность штаммов рода *Pseudomonas*, изолированных из разных экологических ниш // Вестник Пермского университета. Серия Биология. — 2010. — Вып. 1(1). — С. 55–58.
6. Ильинский В.В., Семенов М.Н. Распределение и активность углеводородокисляющих бактерий в Центральном Полярном бассейне, Карском и Белом морях. В.В. Ильинский // Опыт системных океанологических исследований в Арктике. Под ред. А.П. Лисицина. — М: Научный Мир, 2001. — С. 364–376.
7. Кураков А.В. и др. Биоиндикация и реабилитация экосистем при нефтяных загрязнениях — М.: Графикон, 2006. — 336 с.
8. Литвинова М.Ю. и др. Распространение и потенциальная активность углеводородокисляющих бактерий в воде среднего и северного колен Кольского залива // Вестник МГТУ: труды Мурм. гос. тех. ун-та. — 2012. — Т. 15, № 3. — С. 533–541.
9. Льюнг М.Т. и др. Изучение эмульгирующих свойств бактерий-деструкторов углеводородов нефти // Актуальная биотехнология. — 2014. — №3 (10). — С. 108–109.
10. Практическая гидробиология. Пресноводные экосистемы / Под ред. В.Д. Фёдорова, В.И. Капкова. — М.: Изд-во ПИМ, 2006. — 367 с.
11. Серебрякова Е.В. и др. Оценка гидрофобных свойств бактериальных клеток по адсорбции на поверхности капель хлороформа // Микробиология. — 2002. — Т. 71. — № 2. — С. 237–239.
12. Федоренко В.Н. Выделение и оценка биотехнологического потенциала микроорганизмов для утилизации нефтяных загрязнений северных морей: дис. ... канд. биол. наук. — Москва, 2016.
13. Kozhukhova E., Litvinova M. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by bioflocculant-producing microorganisms of the aquatic ecosystems in the Arctic region // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science: — Saint-Petersburg: Institute of Physics Publishing. — 2020. — Vol. 539. — P. 012192.

© Литвинова Марина Юрьевна (litvinovamyu@mauniver.ru); Кожухова Екатерина Вячеславовна (kozkhukhovaev@mauniver.ru); Макаревич Елена Викторовна (makarevichev@mauniver.ru); Гарбуль Анна Викторовна (garbulav@mauniver.ru)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»