

Э. Р. ФАЙЗУЛИНА, О. Н. АУЭЗОВА, Л. Г. ТАТАРКИНА,
Е. А. СВИРКО, А. А. ДАУЛЕТОВА, С. А. АЙТКЕЛЬДИЕВА

(РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан)

НЕФТЕОКИСЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КАСПИЙСКОГО МОРЯ

Аннотация. Из загрязненной воды Каспийского моря выделено 12 активных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов, способных утилизировать более 60% нефти. Из них пять наиболее эффективных штаммов разлагали более 80% нефти. У этих штаммов изучены культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки и определена видовая принадлежность: 16Ш – *Pseudomonas sp.*, 23Ш – *Enterobacter sp.*, 24Ш, 25Ш и 26Ш – *Tetrathiodacter minigarde*.

Ключевые слова: Каспийское море, нефтезагрязненная вода, штаммы нефтеокисляющих микроорганизмов, деструкция, идентификация.

Тірек сөздер: Каспий теңізі, мұнаймен ластанған су, мұнайотықтырғыш микроорганизмдердің штамдары, деструкция, идентификация.

Keywords: the Caspian sea, oil polluted water, the strains of oil-oxidizing microorganisms, destruction, identification.

Нефть является энергосырьевой основой современной цивилизации. В настоящее время общая площадь действующих и перспективных нефтегазоносных районов Республики Казахстан составляет 1 млн 700 тыс. км², что занимает более 60% всей территории страны. Большие перспективы связаны с казахстанским сектором Каспийского шельфа. По экспертным оценкам, прогнозные ресурсы этого шельфа составляют 15 млрд т условного топлива.

Однако рост добычи нефти сопровождается увеличением нагрузок на природные среды. При добыче, транспортировке, переработке и хранении нефти и её производных происходит загрязнение окружающей среды нефтяными углеводородами.

Попавшая в водоемы нефть может переноситься течениями на сотни и тысячи километров от места сброса, проникать в толщу морской воды, накапливаться в донных осадках, воздействуя, таким образом, на все группы организмов. [1].

Проблема создания эффективных, доступных средств для устранения опасных нефтяных загрязнений на воде весьма актуальна для Казахстана. В настоящее время для этих целей используются механические методы для локализации, сбора и удаления нефти с поверхности моря, химические методы диспергирования для ускорения процессов ее рассеивания и микробиологические методы разложения.

В комплексе процессов очищения природных экосистем ведущее место принадлежит биологическим факторам, а именно углеводородоокисляющим микроорганизмам (УОМ). Благодаря их деятельности, нефть трансформируется до простых соединений, происходит накопление органического вещества и его включение в круговорот углерода. Биодegradация углеводородов природными популяциями микроорганизмов представляет собой один из основных механизмов самоочищения водной среды. На способности микроорганизмов разлагать сложные органические соединения нефти основан процесс биоремедиации экосистем, загрязненных нефтью и нефтепродуктами [2– 4].

Целью работы было выделение из нефтезагрязненной воды Каспийского моря активных штаммов микроорганизмов – деструкторов нефти и их идентификация.

Материалы и методы исследований

Объектами исследований служили пробы морской воды, отобранной в районе морского порта г. Актау. Также объектами исследований были активные штаммы нефтеокисляющих бактерий, выделенные из загрязненной нефтью и нефтепродуктами воды Каспийского моря.

Выделение нефтеокисляющих микроорганизмов проводили методом накопительных культур на модифицированной 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 [5–7].

Для изучения нефтеокисляющей активности отобранных штаммов использовали среду ВД. В качестве единственного источника углерода в среду вносили нефть (5%). 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 ДПП «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% (таблица 1). 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.

Была изучена нефтеокисляющая активность отобранных культур при культивировании на минеральной среде с 5% нефтью (таблица 2).

Результаты исследования показали, что все штаммы активно окисляли нефть, при этом степень деструкции составила 60,9-86,8%. Наибольшую активность показали пять культур 16Ш, 23Ш, 24Ш, 25Ш и 26Ш, у которых степень деструкции нефти составила свыше 80%.

У отобранных активных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов были изучены культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства (таблица 3).

Таблица 1 – Скрининг выделенных из морской воды углеводородокисляющих бактерий

Штамм	Активность, баллы	Штамм	Активность, баллы	Штамм	Активность, баллы
1 Ш	2	21 Ш	2	41 Ш	3
2 Ш	4	22 Ш	2	42 Ш	2
3 Ш	2	23 Ш	4	43 Ш	2
4 Ш	3	24 Ш	4	44 Ш	2
5 Ш	4	25 Ш	4	45 Ш	2
6 Ш	4	26 Ш	4	46 Ш	2
7 Ш	1	27 Ш	1	47 Ш	2
8 Ш	1	28 Ш	1	48 Ш	2
9 Ш	4	29 Ш	2	49 Ш	2
10 Ш	4	30 Ш	3	50 Ш	2
11 Ш	2	31 Ш	3	51 Ш	2
12 Ш	2	32 Ш	2	52 Ш	2
13 Ш	4	33 Ш	3	53 Ш	2
14 Ш	4	34 Ш	2	54 Ш	2
15 Ш	3	35 Ш	2	55 Ш	2
16 Ш	4	36 Ш	1	56 Ш	2
17 Ш	3	37 Ш	1	57 Ш	2
18 Ш	2	38 Ш	1	58 Ш	2
19 Ш	2	39 Ш	3	59 Ш	2
20 Ш	3	40 Ш	3	60 Ш	2

Примечание: 1 – слабый рост, 2 – умеренный рост, 3 – хороший рост, 4 – очень хороший рост.

Таблица 2 – Оценка деструктивной активности нефтеокисляющих микроорганизмов, выделенных из Каспийского моря

Штамм	Степень деструкции нефти, %
2 Ш	65,1
5 Ш	60,9
6 Ш	63,5
9 Ш	63,8
10 Ш	67,4
13 Ш	75,2
14 Ш	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

Штамм 16Ш представляет собой подвижные палочки $0,57 \div 0,95-1,43$ мкм с закругленными концами, грамтрицательные, спор не образуют. На питательном агаре культура образует круглые, плоские, бежевые колонии диаметром 3-5 мм. Край колоний ровный, выделяет в среду коричневый пигмент.

Штамм 23Ш представляет собой подвижные короткие палочки с закругленными концами, грамвариабельные, спор не образуют. На питательном агаре культура образует круглые, выпуклые, кремовые колонии диаметром 1-2 мм. Край колоний ровный, пигментов в среду не выделяет.

Штамм 24Ш представляет собой подвижные короткие палочки с закругленными концами, грамтрицательные, спор не образуют. На питательном агаре культура образует круглые, выпуклые, кремовые колонии диаметром 2-3 мм. Край колоний ровный, пигментов в среду не выделяет.

Таблица 3 – Культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки штаммов нефтеокисляющих бактерий

Признаки	Штаммы				
	16Ш	23Ш	24Ш	25Ш	26Ш
Морфология	палочки	палочки	палочки	палочки	палочки
Подвижность	+	+	+	+	+
Окраска по Граму	–	вар.	–	–	–
Каталаза	+	+	+	+	+
Оксидаза	+	–	+	+	+
Отношение к кислороду	аэр.	фак. аэр.	фак. аэр.	фак. аэр.	фак. аэр.
Спорообразование	–	–	–	–	–
Разжижение желатины	+	–	–	–	–
Образование сероводорода	–	+	+	–	–
Образование аммиака	–	–	–	–	–
Образование индола	–	–	–	–	–
Восстановление нитратов до нитритов	+	–	–	–	–
Гидролиз крахмала	+	–	–	–	–
Использование углеводов:					
глюкоза	К	Щ	Щ	Щ	Щ
лактоза	А	Щ	Щ	Щ	Щ
сахароза	К	Щ	Щ	Щ	Щ
арабиноза	–	Щ	Щ	Щ	Щ
ксилоза	–	Щ	Щ	Щ	Щ
Рост на МПБ с NaCl:					
3%	+	+	+	+	+
6,5%	+	+	+	+	+
Рост при разных t-рах:					
4 °С	+	+	+	+	–
37 °С	+	+	+	+	+
42 °С	–	+	+	+	+

Примечание: 1) вар. – грамм вариабельный; 2) А – ассимилируется, К – усваивается с образованием кислоты, Щ – среда подщелачивается

Штамм 25Ш представляет собой подвижные короткие палочки с закругленными концами, грамотрицательные, спор не образуют. На питательном агаре культура образует круглые, выпуклые, кремовые колонии диаметром 2-3 мм. Край колоний ровный, пигментов в среде не выделяет.

Штамм 26Ш представляет собой подвижные короткие палочки с закругленными концами, грамотрицательные, спор не образуют. На питательном агаре культура образует круглые, выпуклые, кремовые колонии диаметром 1-2 мм. Край колоний ровный, пигментов в среде не выделяет.

На основании изученных культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков штаммы идентифицированы следующим образом: 16Ш – *Pseudomonas sp.*, 23Ш – *Enterobacter sp.*, 24Ш, 25Ш и 26Ш – *Tetrathiodibacter minigarde*.

Таким образом, из загрязненной воды Каспийского моря выделено 12 активных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов, способных утилизировать более 60% нефти. Из них пять наиболее эффективных штаммов разлагали более 80% нефти. У этих штаммов изучены культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки и определена видовая принадлежность.

ЛИТЕРАТУРА

1 Серода Т.Г. Биологические методы очистки водоемов от нефти // Тез. докл. междунар. конф. «Новые технологии для очистки нефтезагрязнённых вод, почв, переработки и утилизации нефтешламов». – М., 2001. – С. 12-13.

2 Кураков А.В., Ильинский В.В., Котелевцев С.В., Садчиков А.П. Биоиндикация и реабилитация экосистем при нефтяных загрязнениях. – М.: Графикон, 2006. – 336 с.

- 3 Миронов О.Г. Бактериальная трансформация нефтяных углеводородов в прибрежной зоне моря // Морской экологический журнал. – 2002. – Т. 1, № 1. – С. 56-66.
- 4 Ron E.Z., Rosenberg E. Biosurfactants and oil bioremediation // Current Opinion in Biotechnology. – 2002. – Vol. 13, N 3. – P. 249-252.
- 5 Герхардт Ф. Методы общей бактериологии. В 3 т. – М.: Мир, 1983. – Т. 1. – С. 234-265.
- 6 Практикум по микробиологии / Под ред. А. Н. Нетрусова. – М.: Academia, 2005. – 597 с.
- 7 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.

REFERENCES

- 1 Sereda T.G. Tez. dokl. mezhdunar. konf. «Novye tehnologii dlja ochistki neftezagryzajzjonnyh vod, pochv, pererabotki i utilizacii nefteshlamov». M., 2001. S. 12-13 (In Russ.).
- 2 Kurakov A.V., Il'inskij V.V., Kotelevcev S.V., Sadchikov A.P. Bioindikacija i reabilitacija jekosistem pri nefjtjanyh zagryznenijah. M.: Grafikon, 2006. 336 s. (In Russ.).
- 3 Mironov O.G. Morskoy jekologicheskij zhurnal. 2002. T. 1, N 1. S. 56-66. (In Russ.)
- 4 Ron E.Z., Rosenberg E. Current Opinion in Biotechnology. 2002. Vol. 13, N 3. P. 249-252.
- 5 Gerhardt F. Metody obshhej bakteriiologii. V 3 t. M.: Mir, 1983. T. 1. S. 234-265 (In Russ.).
- 6 Praktikum po mikrobiologii / Pod. red. A. N. Netrusova. M.: Academia, 2005. 597 s. (In Russ.).
- 7 Opredelitel' bakterij Berdzhii. V 2-h t. Per. s angl.; pod red. Dzh. Houлта, N. Kriga, P. Snita, Dzh. Stejli, S. Uil'jamsa. M.: Mir, 1997. 368 s. (In Russ.).

Резюме

Э. Р. Файзулина, О. Н. Әуезова, Л. Г. Татаркина, Е. А. Свирко, А. А. Дәулетова,
С. А. Айткелдиева

(ҚР БҒМ ҒК «Микробиология және вирусология институты» РМК, Алматы, Қазақстан)

КАСПИЙ ТЕҢІЗІНЕН БӨЛІНІП АЛЫНҒАН МИКРООРГАНИЗМДЕРДІҢ ИДЕНТИФИКАЦИЯСЫ ЖӘНЕ МҰНАЙТОТЫҚТЫРҒЫШ БЕЛСЕНДІЛІГІ

Каспий теңізінің ластанған суынан 60% шамасында мұнайды ыдырата алатын 12 белсенді мұнайотықтырғыш микроорганизмдердің штамдары бөліп алынды. Соның ішінде ең нәтижелі бес штамм мұнайды 80% шамасында ыдырата алады. Бұл штамдардың культуралды-морфологиялық және физиология-биохимиялық белгілері мен түрлік ерекшеліктері анықталды: 16Ш – *Pseudomonas sp.*, 23Ш – *Enterobacter sp.*, 24Ш, 25Ш және 26Ш – *Tetrathio bacter minigarde*.

Тірек сөздер: Каспий теңізі, мұнаймен ластанған су, мұнайотықтырғыш микроорганизмдердің штамдары, деструкция, идентификация.

Summary

E. R. Faizulina, O. N. Auezova, L. G. Tatarkina, E. A. Svirko, A. A. Dauletova, S. A. Aitkeldiyeva

(RSE «Institute of Microbiology and Virology» KS MES RK, Almaty, Kazakhstan)

THE OIL-OXIDIZING ACTIVITY AND IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISMS ISOLATED FROM THE CASPIAN SEA

12 active strains of oil-oxidizing microorganisms capable to utilize more than 60% of the oil were isolated from polluted water of the Caspian sea. Among them the five most effective strains decomposed over 80% of the oil. Culture-morphological, physiological and biochemical characteristics of these strains were studied and the species affiliation was determined: 16Sh – *Pseudomonas sp.*, 23Sh – *Enterobacter sp.*, 24Sh, 25Sh and 26Sh – *Tetrathio bacter minigarde*.

Keywords: the Caspian sea, oil polluted water, the strains of oil-oxidizing microorganisms, destruction, identification.

Поступила 20.05.2014 г.