

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕСТА «ЭМУЛЬГИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ» ДЛЯ СКРИНИНГА БАКТЕРИЙ, ДИСПЕРГИРУЮЩИХ НЕФТЬ

К настоящему времени доказано, что не существует узко специфических видов микроорганизмов, способных утилизировать нефть. Механизмы, благодаря которым микроорганизмы осуществляют эту реакцию, связаны с их способностью синтезировать, такие ферменты, как оксидазы, оксигеназы, гидролазы и дегидрогеназы. Поверхностно активные вещества, продуцируемые микроорганизмами, облегчают возможность клеткам взаимодействовать с таким гидрофобным субстратом, как нефть и диспергировать ее [1, 2].

Чаще всего такие показатели, как синтез внеклеточных поверхностно-активных веществ (ВПАВ), обладающих эмульгирующей активностью (ЭА) и высокая гидрофобность поверхности клеток ($\Gamma\%$) связывают со способностью бактерий взаимодействовать с гидрофобными субстратами [2].

В научной литературе приводятся сведения о бактериях, имеющих в определенных условиях высокую гидрофобность поверхности клеток, где величина $\Gamma\%$ – положительная. При отрицательных значениях $\Gamma\%$ возникает ситуация, при которой клетки обладают способностью не просто адсорбироваться на каплях гидрофобного вещества, а диспергировать его и удерживать в водной фазе. Благодаря наличию ПАВ, количество и перераспределение гидрофобных компонентов клеточной поверхности может измениться на-

столько, что клетка становится «гипергидрофобной». Наличие высокой ЭА культуральной жидкости и гидрофобности поверхности клеток ($\Gamma\%$), выявляющее присутствие внеклеточных ПАВ биологической природы, дает возможность предполагать, что именно подобные вещества, синтезируясь клетками, приводят к способности клетки удерживать гидрофобные субстраты в толще воды [1, 3, 4].

Обычно для выделения микроорганизмов, способных деградировать или диспергировать, нефть используют прием, основанный на выращивании их в среде Ворошиловой-Диановой, где в качестве единственного источника углерода вносится нефть. В тоже время существуют ситуации, когда нет необходимости использовать углеводородокисляющие бактерии, так как этот процесс достаточно продолжителен по времени, а возможно, использовать бактерии, способных диспергировать нефть. Особенно актуально это для очистки от остатков нефти в танкерах и резервуарах для хранения нефти. Нами была предпринята попытка выяснить, можно ли использовать такие показатели как эмульгирующая активность культуральной жидкости (ЭА) и гидрофобность поверхности клетки ($\Gamma\%$) для проведения скрининга бактерий, способных диспергировать нефть этот момент слой ПАВ прочно связан с клеткой и возможно удерживание нефть.

Целью данного исследования явилось изучение возможности использовать показатель эмульгирующей активности (ЭА) бактерий для первичного скрининга нефтеокисляющих бактерий.

Материалы и методы исследований

При изучении эмульгирующей активности (ЭА) и гидрофобности клеток (Г%) бактериальные культуры высевали на среду с РПА и далее суспензии 3-х суточных культур высевали в качалочные колбы со средой 8Е [5].

Эмульгирующую активность (ЭА) культуральной жидкости определяли по тесту [5] на ФЭК-56 при длине волны $\lambda=540$ нм.

Гидрофобность клеток (Г%) определяли следующим образом [5]: к отцентрифугированному при 8000 об./мин в течение 15 минут отделенным от надосадочной жидкости клеткам добавляли 3 мл среды 8Е и 2 капли вазелинового масла. Встряхивали на VORTEX GENIE 2 в течение 2 минут, отстаивали 10 минут и затем определяли оптическую плотность раствора. Показатель гидрофобности (Г%) рассчитывали по формуле (1):

$$Г\% = 100 - 100 \times D/D_0, \quad (1)$$

где D – оптическая плотность, после взаимодействия с гидрофобным субстратом; D_0 – оптическая плотность исходной дисперсии.

Для определения способности эмульгировать нефть бактерии выращивали на среде Ворошиловой–Диановой [6] (по 100 мл в колбе) с добавлением 1 мл нефти. Бактерии выращивали на качалке при 28°C.

Белок определяли микрометодом с использованием красителя Кумасси синего [7].

Оптическую плотность определяли на ФЭК-56 при длине волны 540 нм.

Математическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета статистических программ Excel на персональном компьютере «Pentium-IV».

Результаты исследований

Коллекция бактерий, состоящая из 105 штаммов, выделенных из прибрежных почв и илов реки Нуры, была проверена на способность синтезировать внеклеточные ПАВ по показателю эмульгирующей активности и гидрофобности поверхности клеток.

Эмульгирующая активность внеклеточных ПАВ и гидрофобность поверхности клеток бактерий

Видовое название	№ штамма	ОП	Белок, мкг/мл	ЭА, ед. опт. пл.	Г, %
<i>B.coagulans</i>	T.11/32	1,10	153,3±1,33	0,18±0,02	-6,30±0,09
<i>B.firmus</i>	T.11/34	0,06	24,0±0,58	2,60±0,58	-200,0±0,0
<i>B. thuringiensis</i>	T.11/29	2,0	42,7±1,33	0,06±0,007	52,7±1,45
<i>B.coagulans</i>	T.6/17	0,70	93,3±3,53	0,25±0,033	12,6±1,95
<i>B.cereus var. mycooides</i>	BS/22	0,14	11,3±0,88	0,04±0,003	-114,1±15,7
<i>B.coagulans</i>	T.10/75	0,70	153,3±10,9	0,5±0,015	-23,9±4,68
<i>B.firmus</i>	KB/ 33	0,14	208,0±1,0	0,03±0,003	30,0±1,75
<i>P. stutzeri</i>	T.1/13	2,17	274,7±3,53	0,30±0,034	-14,4±1,74
<i>B. licheniformis</i>	T.6/12	2,30	250,7±7,06	0,39±0,006	-9,2±2,85
<i>P. stutzeri</i>	T.11/26	0,18	37,0±2,52	0,71±0,003	-23,3±4,81
<i>B.badius</i>	BB/24	2,00	253,3±9,61	0,04±0,007	-124,9±3,15
<i>B. coagulans</i>	BB/40	1,57	238,7±1,33	0,08±0,003	-214,7±11,6
<i>P. stutzeri</i>	T.1/10	0,76	133,0±8,54	0,22±0,006	8,5±1,10
<i>B. coagulans</i>	T.10/65	0,30	51,0±0,58	1,11±0,01	6,3±3,48
<i>B. coagulans</i>	T.10/77	0,63	114,7±0,33	0,34±0,003	1,67±1,67
<i>B.amyloliquefaciens</i>	T.10/82	1,30	185,0±2,65	0,33±0,007	-428, 2±4,4
<i>B.stearothermophilus</i>	T. 6/3	0,70	121,3±0,88	0,09±0,007	6,0±2,08
<i>P. stutzeri</i>	T. 6/4	0,76	125,0±1,00	0,17±0,000	6,0±1,15
<i>B.stearothermophilus</i>	T. 6/11	1,70	219,0±1,73	0,29±0,006	15,3±1,77
<i>B.licheniformis</i>	T. 6/14	1,65	51,0±1,73	0,46±0,009	-121,2±3,08
<i>B. cereus var. mycooides</i>	BS/ 23	1,07	157,0±2,0	0,09±0,003	17,2±0,93
<i>P. stutzeri</i>	KS/ 28	1,43	284,0±2,31	0,08±0,006	13,3±0,88
<i>B. cereus var. mycooides</i>	KS/ 32	0,77	171,0±3,0	0,08±0,003	23,3±1,76
<i>B.badius</i>	KS/ 33	1,80	184,7±2,40	0,07±0,003	20,3±0,88
<i>B.coagulans</i>	KB/ 36	1,02	139,0±2,0	0,04±0,003	60,1±2,93

Результаты опыта показали, что не все штаммы способны синтезировать внеклеточные ПАВ с высокой эмульгирующей активностью и не все штаммы имели высокую гидрофобность поверхности клеток (табл. 1). Некоторые штаммы обладали высокой эмульгирующей активностью, как например *B.firmus* T.11/34-2,60 ед. ОП; *B.licheniformis* T.6/12 – 0,39 ед.ОП; *Enterobacter aerogenes* T. 11/26 – 0,71 ед. ОП; *B.coagulans* T.10/65 – 1,11 ед. ОП; *B. stearothermophilus* T.6/11)-0,29 ед. ОП; *P. pseudomallei* (T. 6/4) – 0,17 ед. ОП. Другие, наоборот, имели высокие показатели гидрофобности поверхности клеток: *B.amyloliquefaciens* T.10/82 Г% = -428,2%; *B.coagulans* BB/5 Г% = -233,3. Некоторые штаммы имели достаточно высокую гидрофобность поверхности клеток, но со знаком плюс. Например, у *B. thurengiensis* T. 11/29 Г% = 52,7%; а у *B. medusa* T. 1/7 – 28,2%.

Таким образом, из обследованной коллекции у 25 штаммов бактерий из 105 была обнаружена высокая эмульгирующая активность внеклеточных ПАВ либо высокая гидрофобность поверхности клеток.

Наиболее активные эмульгаторы:

P. stutzeri (T.1/13); *B.amyloliquefaciens* (T.10/82) *B. coagulans* (T.10/65); *P. stutzeri* (T.1/10); *P. stutzeri* (T. 11/26); *B. licheniformis* (T.6/12); *B.badius* (BB/ 24); *B.licheniformis* (T.6/14) которые были проверены на способность эмульгировать нефть .

Наблюдения за изменениями нефти проводили через 7, 8 и 21 сутки. Результаты показали, что только 2 штамма из испытанных бактерий *P. stutzeri* (T.1/10) и *B. licheniformis* (T.6/12) не эмульгируют нефть, тогда как все остальные штаммы бактерий за период испытаний изменяли цвет нефти и она находилась в водной фазе в виде хлопьев.

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что первичный скрининг активных культур – диспергаторов нефти можно проводить с использованием таких показателей, как эмульгирующую активность (ЭА) культуральной жидкости и гидрофобность поверхности клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ганиткевич Я.В. Поверхностно-активные вещества микробного происхождения // Биотехнология. 1988. Т. 4, №5. С. 575-583.
2. Garcia O.I., Mukai I.K., Andrade C.B. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on solid medium: effect of some surface – active agents on colony formation // J. Gen. Appl. Microbiol. 1992. V. 38. P. 279-282.
3. Neu T.R. Significance of bacterial surface active compounds in interaction of bacteria with interfaces // Microbiol. Rev. 1996. V. 60, N 1. P. 151-166.
4. Манасбаева А.Б. Роль внеклеточных поверхностно-активных веществ в агрегации и адгезии микроорганизмов: Автореф. ... докт. биол. наук: 25.11.99. Алматы: ИМБ, 1999. 50 с.
5. Iguchi T., Takeda I., Ohsawa H. Emulsifying factor of hydrocarbon produced by a hydrocarbon-assimilating yeast // Agric. Biol. Chem. 1969. V. 33. P. 1657-1658.
6. Герхард Ф. Методы общей бактериологии. М., 1984. С. 308-310.
7. Секверина С.Е., Соловьева Г.А. Практикум по биохимии: учебное пособие. М.: Изд-во МГУ, 1989. 509 с.

Резюме

Клеткалардың беттік гидрофобтығы және дақылдық сұйықтықтың эмульгирлеуші белсенділігі (ЭБ) сияқты, осындай көрсеткіштерді бірге пайдалану арқылы мұнай диспергаторларының белсенді дақылдарының бірінші скринингін жүргізуге болатындығын көрсеткен.

Summary

It is shown, that initial screening of the dispersive petroleum active cultures – can be performed with the help of such parameters, as emulsifying ability (E A) of culture liquids and hydrophobic properties of cell of a surface.

УДК 665.637.631.427

Институт микробиологии
и вирусологии МО Н РК

Поступила 2.03.07г.