

С. А. АЙТКЕЛЬДИЕВА, И. Э. СМИРНОВА, М. Г. САУБЕНОВА, Е. А. ОЛЕЙНИКОВА,
Р. Ш. ГАЛИМБАЕВА, Т. В. КУЗНЕЦОВА, Л. Т. СМАЙЛОВА, А. К. САДАНОВ

БИОДЕГРАДАЦИЯ НЕФТЕПРОДУКТОВ ДРОЖЖАМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ АТАРАУСКОЙ ОБЛАСТИ

(ДГП «Институт микробиологии и вирусологии» РКП «ЦБИ» КН МОН РК, г. Алматы)

Показано, что дрожжи *Candida spp.* ФС-4АТ и *Candida spp.* ФС-2Т способны к биодеградации нефтепродуктов, содержащих легкие фракции углеводородов нефти, таких как гексан, бензин и керосин, а также к усвоению труднодеградируемых нефтепродуктов (дизельное топливо, вазелин и мазут) и к синтезу поверхностно-активных веществ (ПАВ), эмульгирующих нефть.

В настоящее время нефть и нефтепродукты оказывают все большее влияние на биосферу нашей планеты, увеличивая загрязнение окружающей среды. В связи с этим, вопрос борьбы с нефтяным загрязнением почв приобрел особую

остроту. Нефть и нефтепродукты, попадая в почвы, оказывают токсическое действие на почвенную флору и фауну и аккумулируются в тканях организмов. Многие почвы практически утратили способность к самовосстановлению. В плане

использования естественных механизмов природных процессов самоочищения и самовосстановления почв, загрязненных различными отходами хозяйственной деятельности человека, наиболее перспективным и научно-обоснованным является усиление в них жизнедеятельности полезной микрофлоры, способствующей повышению показателей плодородия. Микроорганизмы являются единственной группой живых существ, представители которой обладают способностью использовать углеводороды нефти в качестве источника углеродного питания, и поэтому их роль в процессах превращения нефти в природе уникальна [1]. Именно им принадлежит ведущая роль в процессе самоочищения почв от нефтяного загрязнения путем окисления нефти до простых соединений. Утилизируя ее, они создают клеточную биомассу, которая в дальнейшем вовлекается в круговорот веществ в природе. Поэтому в настоящее время интенсивно разрабатываются различные природоохранные технологии, основанные на стимуляции жизнеспособности полезных представителей микробиоты в почвах и водоемах, путем внесения специальных препаратов углеводородокисляющих микроорганизмов, отселекционированных для наиболее полной утилизации данного типа загрязнения. Однако, зачастую практическое применение их малоэффективно, что связано с использованием препаратов, разработанных для определенных климатических зон и типов почв. Поэтому при разработке технологии биоремедиации так важно учитывать характерные для каждого региона эколого-климатические факторы и условия загрязнения почв и с учетом этих факторов создавать биопрепараты на основе использования аборигенных микроорганизмов.

Способностью утилизировать углеводороды нефти в природе обладают многие группы микроорганизмов. Однако основная роль в биодеструкции нефтезагрязнений почв принадлежит бактериям. Для создания гармонического микробного равновесия в почвах представляется перспективным действовать и другие группы микроорганизмов, способствующие плодородию почв. Особое место при этом принадлежит дрожжам и дрожжеподобным организмам. Дрожжи являются важнейшим звеном в почвенной пищевой цепочке, что способствует повышению ее плодородия, поэтому заслуживают большого внимания при разработке биорекультивационных

технологий [2–4]. Кроме того, дрожжевые организмы в большей степени, чем другие организмы, способны синтезировать поверхностно-активные вещества (ПАВ), которые оказывают эмульгирующее действие на углеводороды загрязненных почв, что положительно влияет на их деструкцию почвенной микрофлорой [5–7].

Поскольку сложность биодеструкции нефтепродуктов заключается в многокомпонентности и разнородности веществ, входящих в состав нефти, при создании искусственных ассоциаций микроорганизмов – нефтедеструкторов необходимо учитывать их трофические особенности. Крайне важным для биоремедиации загрязненных нефтепродуктами почв является отбор микроорганизмов со способностью к утилизации отдельных фракций нефти. В связи с этим, целью настоящей работы было исследование способности дрожжей, перспективных для создания биопрепаратов для биоремедиации нефтезагрязненных почв, к утилизации различных фракций углеводородов нефти, а также изучение их способности к синтезу поверхностно-активных веществ (ПАВ).

Материалы и методы

Объектами исследования служили нефтеокисляющие дрожжи *Candida spp.* штаммы ФС-4АТ и ФС-2Т, выделенные из нефтезагрязненных почв месторождения Косшагыл Атырауской области и показавшие наилучшие результаты по биодеструкции углеводородов нефти.

Для культивирования и оценки нефтеразлагающей активности дрожжевых организмов использовали жидкие минеральные среды: среду Ворошиловой–Диановой и среду Шкидченко–Аринбасарова [8], содержащие нефть в качестве единственного источника углерода и энергии. В качестве нефтепродуктов использовали бензин, керосин, дизельное топливо, вазелин, мазут и гексан в количестве 1 % (по объему). Культивирование проводили в колбах на качалке (180–200 об/мин) при температуре 28–30°C в течение 14 суток. Количественное определение утилизации фракций нефти проводили гравиметрическим методом по суммарному показателю убыли нефтепродуктов в жидкой среде.

Определение эмульгирующей активности культуральной жидкости дрожжей проводили по

методу Iguchi et. al. [9], основанному на измерении внеклеточных поверхностно-активных веществ (ПАВ), продуцируемых дрожжами, на спектрофотометре при $\lambda = 600$ нм.

Количественный контроль роста микроорганизмов осуществляли методом предельных разведений с последующим высевом на чашки Петри с агаром Ворта и средой Ридер и подсчетом колоний [10].

Результаты исследований были статистически обработаны с использованием критерия Стьюдента и измерения считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В результате скрининга, проведенного среди культур, выделенных из нефтезагрязненных

почвенных образцов месторождения Косшагыл Атырауской области, было отобрано два штамма, характеризующихся повышенной способностью к утилизации углеводородов нефти: *Candida spp.* ФС-4АТ и *Candida spp.* ФС-2Т. Учитывая сложный многокомпонентный состав нефти месторождения Косшагыл, исследовали способность этих штаммов дрожжей к утилизации различных фракций нефти, таких как гексан, бензин, керосин, дизельное топливо, вазелин и мазут. Поскольку исследование химического состава водной почвенной вытяжки месторождения Косшагыл показало повышенную соленость, в частности, высокое содержание ионов хлора, в среду культивирования добавляли NaCl в количестве 5 г/л.

В результате проведенных опытов получены данные, приведенные в табл. 1.

Таблица 1. Биодеградация нефтепродуктов и численность дрожжевых организмов

Нефтепродукты	Штаммы дрожжевых организмов			
	ФС-4АТ		ФС-2Т	
	утилизация нефтепродуктов, %	количество микроорганизмов, кл/мл	утилизация нефтепродуктов, %	количество микроорганизмов, кл/мл
Гексан	+*	$8,7 \times 10^8$	+*	$8,7 \times 10^8$
Бензин	+*	$8,2 \times 10^8$	+*	$7,7 \times 10^8$
Керосин	+*	$7,9 \times 10^8$	+*	$4,6 \times 10^8$
Дизель	62,0	$8,0 \times 10^7$	46,0	$6,7 \times 10^6$
Вазелин	10,0	$3,8 \times 10^6$	15,0	$5,7 \times 10^6$
Мазут	20,0	$4,6 \times 10^5$	12,0	$3,6 \times 10^5$

* Количественные показатели не приведены; данные приведены без учета убыли нефтепродуктов в контроле, которая составляла для дизеля 15 %, вазелина – 25 % и мазута – 0.

Из данных табл. 1 видно, что такие нефтепродукты как гексан, бензин и керосин практически полностью утилизированы исследуемыми штаммами дрожжей. При этом прирост биомассы на средах с этими нефтепродуктами был максимальным. Вследствие высокого процента убыли этих углеводородов в контроле (гексана – 93 %, бензин – 90 %, керосина – 78 %) количественные показатели степени деструкции этих фракций нефти дрожжевыми организмами было трудно определить.

Установлено, что утилизация дизельного топлива штаммом *Candida spp.* ФС-4АТ составляла 62 %, мазута – 20 %, а вазелина – 10 % относительно содержания в контроле. Показано, что штамм *Candida spp.* ФС-2Т также хорошо утилизирует гексан, бензин и керосин, что подтверж-

дается количеством клеток микроорганизмов при росте на этих углеводородах. Утилизация дизельного топлива при этом была несколько ниже и составила 47 %, а вазелина выше, чем у штамма ФС-4АТ, и составила 15 % (без учета убыли в контроле).

Таким образом, установлено, что исследуемые штаммы хорошо утилизируют не только гексан, бензин и керосин, содержащие легкие фракции углеводородов нефти (C_6-C_{17}), но также способны к усвоению труднодеградируемых фракций, таких как дизельное топливо ($C_{12}-C_{20}$), вазелин ($C_{18}-C_{25}$) и мазут ($C_{20}-C_{30}$).

По результатам визуальных исследований было установлено, что при культивировании штаммов *Candida spp.* ФС-4АТ и *Candida spp.* ФС-2Т в жидкой среде с 2% тяжелой косшагыл-

ской нефтью, взятой в качестве единственного источника углерода и энергии, уже на третьи сутки нарушалась однородность нефтяной пленки, которая превращалась во взвесь мелких глобул и частиц более светлого цвета, чем нефть. Этот факт свидетельствует о том, что данные штаммы способны синтезировать и выделять поверхностно-активные вещества (ПАВ), эмульгирующие нефть. Учитывая, что активные штаммы-деструкторы планируется использовать для очистки почв, загрязненных нефтью, была изучена эмульгирующая способность данных штаммов дрожжей. Для изучения эмульгирующей активности дрожжи выращивали на среде Шкидченко – Аринбасарова с 1% этанола. Полученные данные представлены в табл. 2.

Таблица 2. Эмульгирующая активность углеводородокисляющих дрожжей на среде с этанолом

Штаммы дрожжей	Эмульгирующая активность, ед. ОП ₆₀₀		
	24 ч	48 ч	72 ч
<i>Candida spp.</i> ФС-4АТ	0,17±0,004	0,17±0,002	0,16±0,002
<i>Candida spp.</i> ФС-2Т	0,10±0,001	0,14±0,002	0,11±0,001
Контроль	0,02±0,001	0,03±0,001	0,03±0,001

Из данных табл. 2 видно, что штаммы *Candida spp.* ФС-4АТ и *Candida spp.* ФС-2Т проявляют эмульгирующую активность на среде с этанолом. Наиболее высокую эмульгирующую активность отмечали у штамма *Candida spp.* ФС-4АТ. Установлено, что эмульгирующая активность обоих штаммов достигала максимальной величины на вторые сутки роста. Именно в этот период происходит выброс веществ, которые, возможно, обладают свойствами биологических ПАВ. Начиная со 2-х суток роста штаммов, эмульгирующая активность культуральной жидкости снижается, что можно объяснить тем, что поверхностно-активные вещества не выделяются в среду, а накапливаются в клетке дрожжей.

Таким образом, показано, что исследуемые дрожжи *Candida spp.* ФС-4АТ и *Candida spp.* ФС-2Т способны утилизировать такие нефтепродукты как гексан, бензин и керосин, содержащие

легкие фракции углеводородов нефти, но и труднодеградируемые, такие как дизельное топливо, вазелин и мазут. Установлено, что исследуемые дрожжи способны синтезировать поверхностно-активные вещества (ПАВ), эмульгирующие нефть. На основе данных штаммов дрожжевых организмов вполне возможно создание микробных препаратов для биоремедиации нефтезагрязненных почв.

ЛИТЕРАТУРА

1. Квасников Е.И., Клюшикова Т.М. Микроорганизмы – нефтедеструкторы нефти в водных бассейнах. Киев: Наукова думка, 1981. 132 с.
2. Предпатент РК №19257 Способ очистки почвы от нефти и нефтепродуктов. Опубл. 15.04.2008, бюл. №4.
3. Предпатент РК №19425 Биопрепарат для очистки от нефти нефтезагрязненных экосистем. Опубл. 15.05.2008, бюл. №5.
4. Исмаилов Н.М., Ахмедов А.Г., Ахмедов В.А. Рекультивация нефтезагрязненных земель сухих субтропиков Азербайджана // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М.: Наука, 1988. С. 206-221.
5. Елинов Н.П. Некоторые микробные полисахариды и их практическое применение // Успехи микробиологии. 1982. Вып. 17. С. 158-177
6. Ганиткевич Я.В. Поверхностно-активные вещества микробного происхождения // Биотехнология. 1988. Т. 4, № 5. С. 575-583.
7. Fickers P. et al. Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential application // FEMS Yeast Research, 2005. V. 5. Iss. 6-7. P. 527-543.
8. Шкидченко А.Н., Аринбасаров М.У. Изучение нефтедеструктивной активности микрофлоры прибрежной зоны Каспийского моря // Прикл. биохим. и микроб. 2002. Т. 38, № 5. С. 509-512.
9. Iguchi T., Takeda I., Ohsawa H. Emulsifying factor of hydrocarbon produce by a hydrocarbon-assimilating yeast // Agric. Biol. Chem. 1969. V. 33. P. 1657-1658.
10. Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. М.: Моск. ун-т, 1976. 306 с.

Резюме

Candida spp. ФС-4АТ және *Candida spp.* ФС-2Т ашықтылары мұнай өнімдерін биодеградациялауға қабілетті бар, олар женіл фракциялы гексан, бензин және керосин, сонымен қатар қын деградацияға үшірайтын мұнай өнімдерін (дизельді отын, вазелин және мазут) ыдыратуға қабілетті.

Summary

It was demonstrated that yeasts *Candida spp.* ФС-4AT and *Candida spp.* ФС-2T degraded light (gecsan, gasoline, kerosene) and heavy oil fractions (fuel oil, vaseline, diesel oil) and synthesized surface active compounds emulsifying crude oil.