

К. А. Антипова, А. С. Мурадян, В. В. Максимова,
В. М. Самыгин, И. Г. Шайхиев

ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА РОСТ И ДЕСТРУКТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Ключевые слова: углеводородоокисляющие микроорганизмы, нефть, дизельное топливо, моторное масло, поверхностно-активные вещества, додецилсульфат натрия, твин 80, тритон X-100.

Исследованы особенности роста и влияние поверхностно-активных веществ на деструктивную активность трёх видов углеводородоокисляющих микроорганизмов. Установлено, степень ассимиляции углеводородных субстратов определялась свойствами бактериального штамма и химической природой окисляемых углеводородов. Бактерии оказались малоэффективными деструкторами дизельного топлива, однако в короткие сроки разлагали моторное масло и сырую нефть. Добавление ПАВ стимулировало рост нефтеокисляющих бактерий в питательной среде и деструкцию нефти в почвенных образцах. Показана эффективность очистки загрязнённых нефтью различных образцов почв каждым из микроорганизмов.

Key words: hydrocarbon oxidizing microorganisms, crude oil, diesel fuel, motor oil, surfactants, Dodecylsulfate Na, Tween 80, Triton X-100.

The features of the growth and influence of surfactants on the destructive activity of three types of hydrocarbon oxidizing microorganisms. The degree of assimilation of hydrocarbon substrates was determined by the properties of the bacterial strain and the chemical nature of the oxidation of hydrocarbons. Bacteria were ineffective destructors of diesel fuel, but in the short term was decomposed motor oil and crude oil. Adding surfactants stimulated the growth of oil-oxidizing bacteria and nutrient degradation of petroleum in soil samples. The efficiency of cleaning oil-contaminated soil samples from each variety of microorganisms.

Введение

Для эффективной очистки природных экологических систем от нефтяных загрязнений всё чаще используют биологический метод, основанный на применении микроорганизмов, способных адаптироваться к токсическим концентрациям нефтепродуктов, вовлекая эти продукты в свой метаболизм и разлагая их до нетоксичных соединений [1]. Однако механизмы микробной деструкции разнообразны и во многом зависят от свойств самого микроорганизма, физико-химических факторов окружающей среды, а также от состава нефти и нефтепродуктов, который отличается вариабельностью и представляет собой смесь широкого набора индивидуальных веществ. Поэтому эффективная биодеструкция нефти и её продуктов возможна лишь путём интродукции штаммов микроорганизмов с установленной активностью в отношении загрязнителя. Также некоторые виды микроорганизмов способны продуцировать растворимые внеклеточные биоэмульгаторы. Причем, одновременное внесение с микроорганизмами биологических поверхностно-активных веществ (биоПАВ) способствует не только эмульгированию и ускорению деструкции нефтяных углеводородов, но и увеличивает биодоступность источника углерода для микроорганизмов [2 - 4].

Целью настоящей работы явилось изучение особенностей развития микробных популяций в синтетической среде на основе нефти и нефтепродуктов и оценка влияния ПАВ на рост и деструктивную активность углеводородоокисляющих микроорганизмов.

Методика

В работе использовались штаммы *Pseudomonas sp. TU10*, *Bacillus sp. TU22* и *Rhodococcus sp.*

из коллекции ВолГТУ, которые засеивались в синтетическую среду М9 [4]. Из ПАВ использовались додецилсульфат натрия (ДСН), твин 80 (полисорбат 80) и тритон X-100.

В качестве субстратов добавлялись дизельное топливо, моторное масло или сырая нефть в количестве 1 %. При инокуляции почвенных образцов нефть добавлялась в объёме 5 %.

Среда готовилась во флаконах емкостью 50 мл, суточные культуры микроорганизмов засеивались из расчета 10^8 кл/мл. Флаконы помещались в термостат при температуре 30-33 °С, периодически отбирая пробы для определения содержания белка и концентрации микробной биомассы. Концентрация биомассы определялась путём посева бактерий на агаровые чашки с последующим подсчётом числа сформировавшихся колоний.

Для оценки содержания белка использовался набор реагентов «Ольвекс Диагностикум» (Чешская Республика) для определения общего белка биуретовым методом, основанным на образовании белком окрашенного комплекса с ионами меди в щелочной среде. Интенсивность окраски образующихся комплексов определялась с помощью ФЭК марки «КФК-2-УХЛ 4.2» (Россия) при длине волны 540 нм.

Определение углеводородоокисляющей активности бактериальных культур осуществлялось гравиметрически в конце экспериментов путем экстракции из культуральной среды остаточного субстрата хлороформом [6]. Степень утилизации субстрата рассчитывалась по разнице исходной и конечной концентрации.

Влияние ПАВ на рост углеводородоокисляющих микроорганизмов исследовалось в среде с мелассой. Суточные культуры бактерий засеивались во флаконы с 50 мл жидкой питательной среды, со-

держателю 0,5 % мелассы и 0,5 % NaCl, pH = 7,2, из расчета 10^8 кл/мл. В пробирки добавлялся ДСН в количестве 0,2 % и 0,4 %; тритон X-100 и твин 80 – по 0,05 %, 0,1 % и 0,2 %. Контролем служила среда без диспергентов. Засеянные флаконы инкубировались при 30 °С в течение 48 ч, после чего определялась концентрация клеток путём посева материала из соответствующих разведений на агаровые чашки. Последние помещались в термостат при 30°С, через 2 суток подсчитывалось число сформировавшихся колоний и определялась концентрация жизнеспособных клеток.

Влияние ПАВ на рост микроорганизмов исследовалось в синтетических средах на основе нефти. Диспергенты добавлялись в среду в оптимальных для каждого микроорганизма концентрациях: 0,4 % ДСН для *Pseudomonas sp. TU 10*, 0,05 % твина 80 для *Bacillus sp. TU 22* и 0,2 % тритона X-100 для *Rhodococcus sp.* Микроорганизмы засеивались в количестве 10^8 кл/мл во флаконы с питательной средой, содержащей детергент и нефть в количестве 1 %. В контрольных флаконах содержалась среда без детергента. Флаконы инкубировались при 30 °С, пробы отбирались через 24, 48 часов и 7 суток для определения концентрации клеток.

Влияние ПАВ на углеводородокисляющую активность микроорганизмов в почвенных образцах изучалось на искусственно загрязнённых нефтью почвах. Для этого использовали чернозёмную и песчаную почвы, которые подсушивались при комнатной температуре в течение двух суток и в количестве 15 г помещались в чашки Петри. Затем добавлялось 5 % нефти, один из препаратов и вносились исследуемые штаммы микроорганизмов из расчёта 10^8 клеток на 1 г почвы. В почвенные образцы, инокулируемые названными штаммами, добавлялись, соответственно, твин 80 (0,05 %), ДСН (0,4 %) и тритон X-100 (0,2 %). Контролем служила среда без указанных соединений. Инокулированную почву оставляли при комнатной температуре в течение 7 суток, после чего определялось остаточное содержание нефти путем экстракции хлороформом [6].

Обсуждение результатов

При культивировании бактерий в синтетической среде на основе нефти, как наиболее распространённого углеводородного поллютанта, во всех случаях наблюдалось увеличение концентрации биомассы по сравнению с контрольной средой (без нефти). Наиболее существенное увеличение микробной биомассы отмечено через 24-48 ч, после чего концентрация клеток снижалась, достигая значений, сопоставимых с контрольной средой.

При выращивании в среде с дизельным топливом из трёх бактериальных культур лишь у штамма *Pseudomonas sp. TU 10* отмечен определённый рост, тогда как концентрация биомассы двух других микроорганизмов несколько снижалась по отношению к посевной дозе, оставаясь в пределах $(1,0-4,2) \cdot 10^6$ кл/мл на протяжении всего эксперимента. Во всех случаях наиболее высокая концентрация биомассы отмечалась спустя двое суток с

момента инокулирования среды бактериальной культурой (табл. 1).

Таблица 1 - Концентрация биомассы и содержание белка в процессе культивирования микроорганизмов на различных углеводородных субстратах

Штамм микроорганизма	Время выращивания, сутки	Используемый субстрат			
		дизельное топливо		моторное масло	
		концентрация биомассы, кл/мл	содержание белка, г/л	концентрация биомассы, кл/мл	содержание белка, г/л
<i>Bacillus sp. TU 22</i>	1	$3,9 \times 10^6$	58,33	$4,0 \times 10^6$	56,67
	2	$4,2 \times 10^6$	71,67	$7,5 \times 10^6$	173,33
	6	$4,1 \times 10^6$	68,33	$2,5 \times 10^6$	46,67
	7	$4,0 \times 10^6$	40,00	-	-
	8	$3,8 \times 10^6$	36,67	$2,0 \times 10^6$	25,67
<i>Rhodococcus sp.</i>	1	$2,2 \times 10^6$	80,00	$1,7 \times 10^7$	80,00
	2	$2,3 \times 10^6$	103,30	$4,2 \times 10^7$	133,33
	6	$1,0 \times 10^6$	53,33	$2,6 \times 10^7$	31,67
	7	$1,0 \times 10^6$	25,00	-	-
	8	$1,0 \times 10^6$	23,33	$1,8 \times 10^7$	26,67
<i>Pseudomonas sp. TU 10</i>	1	$6,7 \times 10^8$	57,33	$2,1 \times 10^7$	60,00
	2	$1,8 \times 10^9$	63,33	$2,5 \times 10^7$	126,67
	6	$4,5 \times 10^8$	50,00	$2,1 \times 10^7$	27,33
	7	$2,3 \times 10^8$	26,67	-	-
	8	$1,8 \times 10^8$	25,00	$1,2 \times 10^7$	21,67

Развитие микроорганизмов сопровождалось биосинтезом белка, экспрессия которого наиболее отчетливо наблюдалась у родококков. Максимальная концентрация белка при использовании указанного штамма превышала аналогичные показатели в экспериментах с применением двух других видов в 1,4 и 1,6 раза (для *Pseudomonas sp. TU 10* и *Bacillus sp. TU 22*), соответственно.

Следует отметить, что наиболее интенсивный биосинтез белка зарегистрирован у двухсуточных культур, т.е. происходил одновременно с ростом микробных популяций.

При посеве культур бактерий в среду, содержащую моторное масло, происходило снижение

концентрации клеток каждого из трёх микроорганизмов, особенно заметное к концу экспериментов.

Микроорганизмы по-разному ассимилировали углеводородные субстраты. В результате проведения экспериментов отмечено, что исследуемые культуры микроорганизмов обладали слабо выраженной активностью в отношении дизельного топлива, утилизируя названное углеводородное сырьё не более чем на 2,6 %.

Наименьшую активность проявляли псевдомонады, более высокие показатели отмечены у представителя рода *Bacillus*. Родоккокки в этом отношении занимали промежуточное положение. Степень ассимиляции дизельного топлива составила 0,6 %; 2,6 %; 2,3 % соответственно, хотя в литературе имеются данные о высокой активности некоторых культур к этому субстрату [7].

Вместе с тем, все бактериальные культуры эффективно ассимилировали моторное масло. Родоккокковые микроорганизмы за короткий период использовали в качестве единственного источника углерода и энергии примерно половину из внесённого в культуральную среду субстрата (50,1 %), а степень утилизации моторного масла двумя другими видами бактерий приближалась к 80 %.

Результаты исследований влияния ПАВ на рост углеводородоокисляющих микроорганизмов в углеводной среде с мелассой, представлены на гистограммах, приведенных на рисунках 1-3.

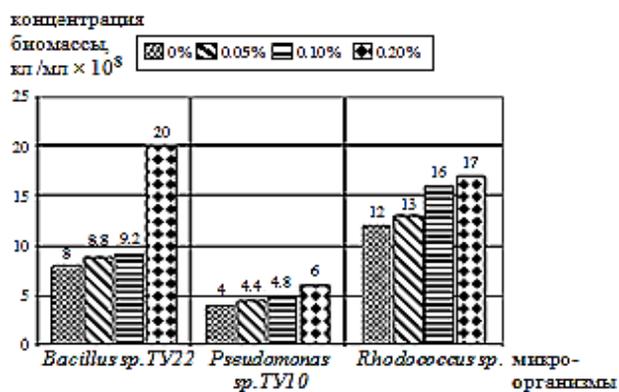


Рис. 1 - Влияние различных концентраций диспергирующих веществ на рост микроорганизмов в углеводной среде с мелассой тритона X-100

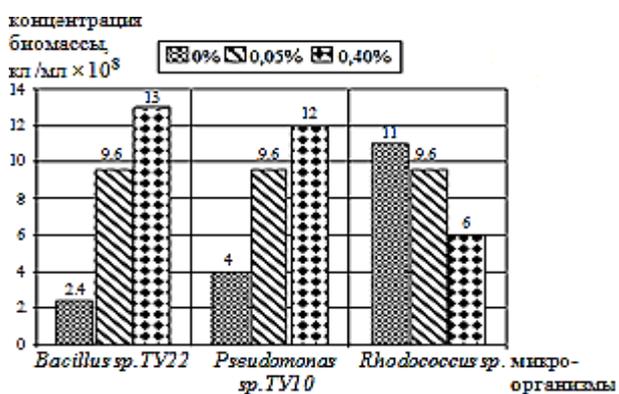


Рис. 2 - Влияние различных концентраций диспергирующих веществ на рост микроорганизмов в углеводной среде с мелассой додецилсульфата натрия

Как видно из представленных рисунков 1-3, ПАВ по-разному влияли на развитие бактериальных штаммов. Тритон X-100 проявлял стимулирующее действие в отношении всех исследуемых видов микроорганизмов, тогда как остальные соединения стимулировали рост лишь двух из исследованных бактериальных культур (рис. 1). Добавка в питательную среду тритона X-100 в количестве 0,05-0,2 % повышала урожайность биомассы в 1,1-2,5 раза. Проведёнными экспериментами определено, что оптимальная концентрация препарата составила 0,2%. Добавление ДСН позитивно сказывалось на развитии *Bacillus sp. TY 22* и *Pseudomonas sp. TY 10* (рис. 2). При этом урожайность биомассы двух видов бактерий увеличивалась с повышением концентрации препарата в питательной среде. Наиболее высокие показатели отмечены при содержании детергента в количестве 0,4 %. В этих случаях концентрация биомассы *Pseudomonas sp. TY 10* и *Bacillus sp. TY 22* возрастала по сравнению с контрольной средой, соответственно, в 3 и 5,4 раза. Размножение родоккокков снижалось с увеличением концентрации названного реагента. Подобное воздействие анионоактивных ПАВ на другие грамположительные бактерии зависело от химического строения и усиливалось с увеличением числа углеродных атомов и при снижении pH среды [8].

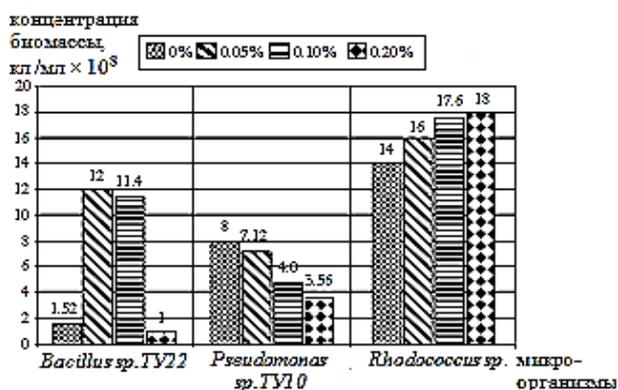


Рис. 3 - Влияние различных концентраций диспергирующих веществ на рост микроорганизмов в углеводной среде с мелассой твина 80

Твин 80 благоприятно влиял на размножение родоккокков и бацилл, но не псевдомонад. Из трёх испытуемых препаратов он обладал наиболее эффективным действием, которое особенно проявлялось по отношению к *Bacillus sp. TY 22* и в меньшей степени - к родоккоккам (рис. 3). Урожайность биомассы в этих случаях увеличивалась в 8 и в 1,3 раза соответственно. Оптимальные концентрации твина составляли 0,05-0,1 %. На рост псевдомонад препарат в указанных концентрациях оказывал негативное воздействие, что сопровождалось снижением биомассы на 11,3-55,0 %. Между тем известно, что неионогенные ПАВ, включая твины, как правило, обладают слабым антимикробным действием, а некоторые из них и вовсе не активны. Токсическое действие неионогенных ПАВ определяется, главным образом, неполярной частью молекулы и более выражено при наличии в молекуле ароматического кольца [9].

Результаты исследования роста микробных популяций в синтетической среде с нефтью и детергентами представлены на рисунке 4.

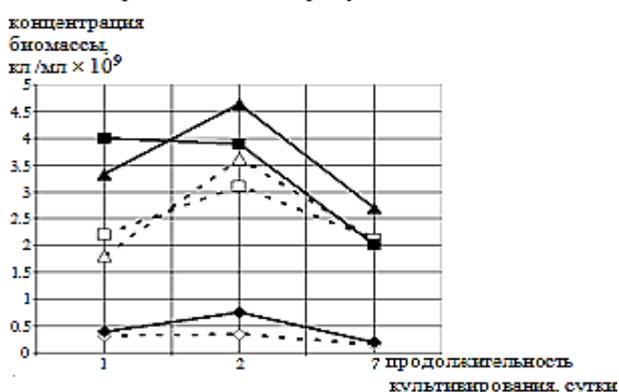


Рис. 4 - Влияние диспергирующих веществ на рост микроорганизмов в синтетической среде на основе нефти:

- ▲ - рост *Pseudomonas sp. TY 10* в среде с ДСН
- △ - контроль *Pseudomonas sp. TY 10*
- - рост *Rhodococcus sp.* в среде с тритоном X-100
- - контроль *Rhodococcus sp.*
- ◆ - рост *Bacillus sp. TY 22* в среде с твином 80
- ◇ - контроль *Bacillus sp. TY 22*

Таким образом, исследуемые микроорганизмы оказались способными расти на всех исследуемых углеводородных субстратах. Наиболее интенсивный рост наблюдался у двухсуточных культур и сопровождался биосинтезом бактериальными клетками белковых молекул. Микроорганизмы по-разному ассимилировали углеводородные субстраты и эта способность определялась, как свойствами самого бактериального штамма, так и химической природой окисляемых углеводородов. Бактерии оказались малоэффективными деструкторами дизельного топлива, однако, каждый из них в короткие сроки проявлял высокую деструктивную активность в отношении моторного масла и нефти. Добавление ПАВ оказывает стимулирующее действие на рост нефтеокисляющих бактерий и положительно сказывалось на деструкции нефти в почвенных образцах. Эффективность процессов роста и деструкции углеводородов каждым из микроорганизмов зависела от химической природы и концентрации испытуемого детергента. Степень очистки почвенных образцов исследуемыми штаммами в присутствии детергентов заметно возрастала, при этом очистка от нефти песчаной почвы оказалась выше, чем чернозёмной.

Добавление детергентов в синтетическую углеводородную среду во всех случаях приводило к увеличению концентрации бактериальной суспензии по сравнению со средой контрольной. Особенно названное обстоятельство было заметно через 24-48 ч с момента посева бактерий, когда увеличение биомассы родококков и псевдомонад приближалось, а бацилл двукратно превышало соответствующие показатели для контрольной среды. Последующее культивирование бактерий до 7 суток не приводило к росту бактерий, а в отдельных случаях (*Rhodococcus sp.*) концентрация клеток заметно снижалась, хотя оставалась более чем на порядок выше посевной дозы.

Добавление в почву ПАВ (с целью изучения их влияния на углеводородокисляющую активность микроорганизмов), положительно сказывалось на деструкции нефти всеми исследуемыми микроорганизмами. Интенсивность ассимиляции субстратов в почвах, содержащих детергенты, увеличивалась от 22 до 81 %. Очистка почвенных образцов штаммом *Pseudomonas sp. TY 10* при добавлении ДСН увеличивалась в 1,2 раза, деструктивная активность *Bacillus sp. TY 22* в присутствии твина 80 возрастала в 1,4 раза, а в образцах почв с тритоном X-100 степень очистки *Rhodococcus sp.* в 1,8 раз превышала таковой показатель для контрольных образцов.

Литература

- Л.Т.Т. Дао, Т.В. Григорьева, К.К. Нго, О.И. Якушева, В.Н. Никонорова, О.Н. Ильинская, *Вестник Казанского технологического университета*, **16**, 10, 182-185 (2013).
- Grazyna Plaza, Krystof Ultig, Robin L. Brigmon, *Acta microbial. Pol.*, **52**, 2, 173-182 (2005).
- Н.Н. Волченко, Э.В. Карасева *Биотехнология BIR*, **2**, 57-62 (2006).
- А. В. Поляков, А. Н. Даниленко, А. Д. Шутов, И. Г. Плащина, В. Ф. Шкодич, А. М. Кочнев, Г. Е. Заиков, *Вестник Казанского технологического университета*, **17**, 1, 210-215 (2014).
- Е.З. Теппер, *Практикум по микробиологии*. Колос, Москва, 1979, 216 с.
- З. М. Ермоленко, В. А. Чугунов, В. Н. Герасименко, *Биотехнология BIR*, **66**, 5, 33-38 (1997).
- ООО «Башгеопроект», *2 Научно-практическая Международная Конференция Новые технологии в решении экологических проблем ТЭК*, Москва, 2007.
- Т. В. Коронелли, *Успехи микробиологии*, **15**, 99-111 (1980).
- Т. В. Коронелли, Т. И. Комарова, А. В. Игнатенко, *Микробиология*, **52**, 1, 94-97 (1983).

© К. А. Антипова - магистр каф. промышленной экологии и безопасности жизнедеятельности Волгоградского госуд. техн. ун-та, jockerlo@mail.ru; А. С. Мурадян - асп. той же кафедры; В. В. Максимова - магистр той же кафедры; В. М. Самыгин - д.м.н., профессор той же кафедры; И. Г. Шайхиев - д.т.н., зав. каф. инженерной экологии КНИТУ.