

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 углеводородокисляющих микроорганизмов. Методика В работе использовались штаммы *Pseudomonas* sp. ТУ10, *Bacillus* sp. ТУ22 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 10⁸ 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 углеводородокисляющей 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 углеводородокисляющих микроорганизмов исследовалось в среде с мелассой. Суточные культуры бактерий засеивались во флаконы с 50 мл жидкой питательной среды, содержащей 0,5 % мелассы и 0,5 % NaCl, pH = 7,2, из расчёта 108 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. ТУ 10, 0,05 % твина 80 для *Bacillus* sp. ТУ 22 и 0,2 % тритона X-100 для *Rhodococcus* sp. Микроорганизмы засеивались в количестве 108 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 108 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. ТУ 10 отмечен определенный рост, тогда как концентрация биомассы двух других микроорганизмов несколько снижалась по отношению к посевной дозе, оставаясь в пределах (1,0-4,2) • 10⁶ 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	концентрация биомассы, кл/мл	содержание белка, г/л
<i>Bacillus sp. TU 22</i>	1	3,9×10 ⁶	58,33	4,0×10 ⁶	56,67
	2	4,2×10 ⁶	71,67	7,5×10 ⁶	173,33
	6	4,1×10 ⁶	68,33	2,5×10 ⁶	46,67
<i>Rhodococcus sp. 1</i>	2,2×10 ⁶	80,00	1,7×10 ⁷	80,00	2
	2,3×10 ⁶	103,30	4,2×10 ⁷	133,33	6
	1,0×10 ⁶	53,33	2,6×10 ⁷	31,67	7
<i>Pseudomonas sp. TU 10</i>	1	6,7×10 ⁸	57,33	2,1×10 ⁷	60,00
	2	1,8×10 ⁹	63,33	2,5×10 ⁷	126,67
	6	4,5×10 ⁸	50,00	2,1×10 ⁷	27,33
	7	2,3×10 ⁸	26,67	-	-
	8	1,8×10 ⁸	25,00	1,2×10 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 сырье не более чем на 2,6 %. Наименьшую активность проявляли псевдомонады, более высокие показатели отмечены у представителя рода *Bacillus*. Родококки 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. Родококковые микроорганизмы за короткий период использовали в качестве единственного источника углерода и энергии примерно половину из внесенного в культуральную среду субстрата (50,1 %), а степень утилизации моторного масла двумя другими видами бактерий приближалась к 80 %. Результаты исследований влияния ПАВ на рост углеводородокисляющих 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. Проведенными экспериментами определено, что оптимальная концентрация препарата составила 0,2%. Добавление ДСН позитивно сказывалось на развитии *Bacillus* sp. ТУ 22 и *Pseudomonas* sp. ТУ 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. ТУ 10 и *Bacillus* sp. ТУ 22 возрастала по сравнению с контрольной средой, соответственно, в 3 и 5,4 раза. Размножение родококков снижалось с увеличением концентрации названного реагента. Подобное воздействие анионноактивных 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 родококков и бацилл, но не псевдомонад. Из трёх испытываемых препаратов он обладал наиболее эффективным действием, которое особенно проявлялось по отношению к *Bacillus* sp. ТУ 22 и в меньшей степени - к родококкам (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. ТУ 10 в среде с ДСН - контроль *Pseudomonas* sp. ТУ 10 - рост *Rhodococcus* sp. в среде с тритоном X-100 - контроль *Rhodococcus* sp. - рост *Bacillus* sp. ТУ 22 в среде с твином 80 - контроль *Bacillus* sp. ТУ 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 углеводородоокисляющую 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. ТУ 10 при добавлении ДСН увеличивалась в 1,2 раза, деструктивная активность *Bacillus* sp. ТУ 22 в присутствии твина 80 возрастала в 1,4 раза, а в образцах почв с тритоном Х-100 степень очистки *Rhodococcus* sp. в 1,8 раз превышала таковой показатель для контрольных образцов.