

**КЛЮЯНОВА МАРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА**  
**РАЗРАБОТКА ОСНОВЫ БИОПРЕПАРАТА**  
**ДЛЯ ДЕГРАДАЦИИ НЕФТИ**  
**ПРИ ЗАГРЯЗНЕНИИ ПРИРОДНЫХ СРЕД**

03.00.23 - биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Уфа-2009

Работа выполнена в научно-исследовательской лаборатории микробиологического мониторинга кафедры «Прикладная биология и микробиология» Астраханского государственного технического университета

**Научный руководитель** доктор биологических наук, профессор  
**Сопрунова Ольга Борисовна**

**Официальные оппоненты** доктор биологических наук, профессор  
**Ибрагимов Ренат Исмагилович**

доктор биологических наук, с.н.с.  
**Силищев Николай Николаевич**

**Ведущая организация** **Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь**

Защита диссертации состоится «23» декабря 2009 г. в 12.00. часов на заседании Объединенного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций ДМ 002.136.01 при Институте биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г. Уфа, Проспект Октября, 69, тел/факс: 8 (347) 235-62-47, e-mail: [ib@anrb.ru](mailto:ib@anrb.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Уфимского научного центра РАН и на официальном сайте АН РБ по адресу: <http://www.anrb.ru/inbio/dissovet>

Автореферат разослан «24» ноября 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук, доцент



Р.В. Уразгильдин

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Актуальной проблемой современной экологии является восстановление нефтезагрязненных почвенных и водных экосистем, так как зачастую нефтяное загрязнение приводит к необратимым изменениям биологического равновесия и разнообразия. В связи с этим, проблемы, связанные с разработкой способов и методов защиты окружающей среды от нефти и нефтепродуктов, являются в настоящее время наиболее остро стоящими и актуальными.

Существующие биотехнологические методы защиты окружающей среды от техногенных загрязнений основаны на использовании микроорганизмов-деструкторов, имеющих в своем составе специфические ферментные системы, осуществляющие катаболизм нефтяных углеводородов (Логинов, 2000). Традиционно разрабатываемые и применяемые технологии, базируются на использовании моно- или поликультур микроорганизмов (Коронелли, 1996; Логинов, 2000; Ягафарова, 2001; Кураков и др., 2006).

Эффективность применения бактерий в качестве деструкторов нефтяных углеводородов может снижаться за счет появления в популяции неактивных форм микроорганизмов, то есть диссоциантов. Известно (Милько и др., 1991; Нетрусов, 2006), что диссоцианты могут синтезировать разное количество биологически активных веществ, спектр которых может различаться. Так, например, у М-клеток, как правило, образуется максимальное количество экзопродуктов, а R-варианты активнее разрушают ксенобиотики, так как они устойчивее к токсическим веществам. Основными факторами, влияющими на образование биосурфактантов способствующих активному разложению нефтяных углеводородов, относятся условия культивирования продуцента (природа и концентрация источников углерода и азота), рН, температуры, фазы роста культуры и концентрация микроорганизмов (Абрамзон и др., 1988; Desai et al., 1997; Картель, 2007; Гоготов и др., 2008).

В связи с этим, практический интерес представляет получение и использование устойчивых вариантов бактерий не только для стабилизации выхода синтезируемых клетками биологически активных веществ, но и процессов биотрансформации ксенобиотиков (Фурсова и др., 2005).

Таким образом, поиск устойчивых вариантов углеводородокисляющих бактерий, обладающих высокой биодеструкционной активностью в отношении нефтепродуктов, является весьма актуальным, так как на рынке Российской Федерации на данный момент существует лишь один патент на основе R-диссоциантов штаммов родококков - биопрепарат «Родер» (Патент РФ № 2174496).

**Цель исследований.** Выделение из нефтезагрязненных экосистем Прикаспийской Низменности штаммов микроорганизмов, обладающих углеводородокисляющей активностью, и изучение их в качестве основы биопрепарата для деструкции нефтяных углеводородов.

**Задачи исследований:**

1. Выделить из нефтезагрязненных экосистем штаммы микроорганизмов, обладающие углеводородокисляющей активностью и изучить их культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства.

2. Провести скрининг наиболее активных штаммов-деструкторов сырой нефти и провести их генетическую идентификацию.

3. Изучить влияние культурально-морфологической изменчивости бактериальных штаммов на их физиолого-биохимические свойства и подобрать оптимальные питательные среды для получения наиболее устойчивых вариантов культур с максимальной активностью в отношении деградации нефтяных углеводородов.

4. Определить эффективность использования бактериальных штаммов для биодegradации углеводородов сырой нефти.

**Научная новизна работы.** Из нефтезагрязненных экосистем выделены и идентифицированы новые штаммы бактерий, проявляющие деструкционную активность в отношении нефтяных углеводородов.

Впервые изучена фенотипическая диссоциация *Bacillus firmus* штамм SDS-1 и *Staphylococcus xylosum* штамм SK, выделены и описаны колониально-морфологические варианты этих бактерий.

Для каждого штамма впервые изучена эмульгирующая способность и определена оптимальная питательная среда, на которой индекс эмульгирования максимален.

Впервые изучена способность штаммов *Bacillus firmus SDS-1* и *Staphylococcus xylosus SK* участвовать в биотрансформации нефти.

**Практическая значимость.** Предложены новые штаммы *Bacillus cereus A1*, *Bacillus firmus SDS-1*, *Pseudomonas aeruginosa X1* и *Staphylococcus xylosus SK*, которые могут быть использованы в качестве деструкторов нефтяных углеводородов.

В модельных условиях выявлено, что наибольшей активностью среди изученных микроорганизмов в отношении нефтяных углеводородов обладают штаммы, имеющие меньшее количество диссоциативных переходов.

Представленные экспериментальные данные показывают способность штаммов *Bacillus firmus SDS-1* и *Staphylococcus xylosus SK* продуцировать эмульгирующий агент и использовать нефтяные углеводороды в качестве источника питания и энергии в диапазоне солености 0,0-2,4 % и 0,0-10,0 % NaCl соответственно, что указывает на их галотолерантность.

Штаммы *Bacillus firmus SDS-1* и *Staphylococcus xylosus SK* помещены во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов, подана заявка на выдачу патента Российской Федерации, что позволяет рекомендовать данные штаммы бактерий для разработки биопрепарата для деградации нефтяных углеводородов.

Результаты исследований являлись частью хоздоговорных работ «Разработка биологического способа защиты экосистемы Северного Каспия от разливов нефтяных углеводородов при их поиске, добыче и транспортировке компанией ОАО «ЛУКОЙЛ» и научно-исследовательской работы по гранту РФФИ 05-04-96507 «Перспективные биотехнологии очистки вод и почв от нефтяных углеводородов». Инновационные проекты, включающие результаты диссертационных исследований, отмечены золотой медалью IV-го Московского Международного салона инноваций и инвестиций (Москва, 2004) (проект «Перспективные технологии очистки вод и почв от нефтепродуктов»); серебряной медалью VIII-го Московского Международного салона инноваций и инвестиций (Москва, 2008) (проект «Селекция природных микроорганизмов для биоремедиации природных и техногенных экосистем»); Дипломом 1-й степени

конкурса инновационных проектов Каспийского инновационного форума (Астрахань, 2009).

Материалы исследований используются в учебном процессе – для подготовки студентов института рыбного хозяйства, биологии и природопользования и являются составной частью фундаментальной исследовательской темы «Исследование возможности восстановления техногенных экосистем для использования в народном хозяйстве» кафедры "Прикладная биология и микробиология" Астраханского государственного технического университета.

**Апробация работы.** Результаты исследований были представлены на Нижневолжском конкурсе исследовательских работ (Астрахань, 2003), Молодежной конференции «Астраханская губерния в XXI веке» (Астрахань, 2003), Международной отраслевой студенческой научной конференции (Астрахань, 2005), 2-м Всероссийском конкурсе студенческих научных работ, посвященном 250-летию МГУ им. М.В.Ломоносова и 200-летию Московского общества испытателей природы (Москва, 2005), школе-конференции «Генетика микроорганизмов и биотехнология», посвященной 100-летию со дня рождения С.И.Алиханяна (Москва-Пушино, 2006), VIII-м Московском международном салоне инноваций и инвестиций (Москва, 2008 г), Каспийском инновационном форуме (Астрахань, 2009), 1-ой открытой научно-практической конференции молодых работников Газопромыслового управления ООО «Газпромдобыча Астрахань» (Астрахань, 2009). Результаты исследований также представлены в отчетах о научно-исследовательской работе «Особенности биоразнообразия природных экосистем Нижнего Поволжья» кафедры «Прикладная биология и микробиология» АГТУ (госбюджетные, промежуточные 2005, 2006 г.г. УДК 34.35.12., № гос.регистрации 01.2.006.05145, заключительный УДК 34.35.12., № гос.регистрации 01.2.009.00158).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в Перечень ВАК. Подана заявка № 2009107427 (20/009939) на выдачу патента «Штамм *Bacillus firmus* SDS-1 для деградации нефтяных углеводов» / Сопрунова О.Б., Гальперина А.Р., Ключаева М.А.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, методической части, изложения результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Материалы диссертации изложены на 236 страницах машинописного текста, иллюстрированы 23 таблицей и 43 рисунками.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выделение и первичный скрининг углеводородокисляющих микроорганизмов осуществляли из образцов почв, отобранных в районе нефтедобывающих скважин Республики Калмыкия, шельфовых вод Северного Каспия, нефтебазы города Астрахани.

В работе использовали чистые культуры бактерий *Bacillus cereus A1*, *Bacillus firmus SDS-1*, *Pseudomonas aeruginosa X1* и *Staphylococcus xylosus SK* (табл.1).

Таблица 1

Список чистых культур микроорганизмов

№	Условное обозначение культуры	Объект, из которого выделена культура	Идентификация культуры
1	штамм А1	Почва буровой площадки Баирская Республики Калмыкия	<i>Bacillus cereus A1</i>
2	штаммы 4-1/4-2	Циано-бактериальные сообщества, выделенные из шельфовых вод Северного Каспия в районе разведочного бурения нефтяных скважин	<i>Bacillus firmus SDS-1</i>
3	штамм X1	Почво-грунты нефтебазы, расположенной в черте города Астрахани	<i>Pseudomonas aeruginosa X1</i>
4	штамм M1		<i>Staphylococcus xylosus SK</i>

**Выделение чистых культур микроорганизмов.** Для выделения чистых культур микроорганизмов с углеводородокисляющими свойствами использовали метод накопительных микробных культур (Руководство к практическим занятиям по микробиологии, 1983). Для получения накопительной культуры из почвенных образцов использовали минеральную среду следующего состава (г/л):  $\text{KNO}_3$  – 4,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,6;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 0,6;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  – 1,4;  $\text{MgSO}_4$  – 0,8. Единственным источником углерода и энергии служила сырая нефть, отобранная на Баирском

месторождении Республики Калмыкия. Культивирование проводили при температуре 28<sup>0</sup>С в стационарной культуре и на качалке при 190 об/мин. Чистые культуры микроорганизмов из накопительной культуры выделяли высевом суспензии на плотные питательные среды (МПА, агары Чапека, крахмальный, для углеводородокисляющих микроорганизмов) (Теппер, 2004; Практикум по микробиологии, 2005).

Выделение углеводородокисляющих микроорганизмов из циано-бактериальных сообществ вод Северного Каспия, производили на агаре Чапека и водном агаре по Эрскову. В чашки Петри при посеве добавляли одну из фракций: мазут, машинное и моторное масла, нефть (на 200 мл среды – 1% фракции). Для посева использовали суспензию циано-бактериальных тяжелей, культивируемых в лабораторных условиях на жидкой среде SNAX с добавлением 0,27 % соли, а также 1,0 и 2,0% по объему сырой стерильной нефти. Посев осуществлялся глубинным и поверхностным способами. Культивирование посевов производилось в термостате при температуре 22-25<sup>0</sup>С (Сопрунова, 2005).

Определение культуральных, морфологических и физиолого-биохимических свойств культур проводили по стандартным методикам (Теппер, 2004; Практикум по микробиологии, 2005).

Предварительную идентификацию выделенных микроорганизмов проводили по культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам, используя «Определитель бактерий Берджи» Дж. Хоулта и др. (1997). Видовую идентификацию бактериальных штаммов проводили путем секвенирования фрагментов гена 16S рРНК в Центре Биоинженерии РАН и ФГУП «ГосНИИГенетика».

**Определение физиолого-биохимических свойств чистых культур.** Первичный скрининг бактериальных штаммов производили на основе изучения их способности усваивать жидкие нелетучие углеводороды методом лунок по Егорову (Егоров, 1976; Практикум по микробиологии, 1976; Руководство к практическим занятиям по микробиологии, 1983; 2003) и методом Купера для определения эмульгирующей активности (Cooper, Goldenberg, 1987; Ившина и др., 2004).

Изучение потребностей штаммов бактерий в различных источниках углерода и азота, осуществляли путем посева на ряд специфических сред (Руководство к



практическим занятиям по микробиологии, 1983; Теппер, 2004; Практикум по микробиологии, 2005):

- среда для изучения потребления источников углерода (г/л): пептон – 5,0;  $K_2HPO_4$  – 1,0; углеводы – 10,0;

- среды для изучения потребления молекулярного азота (Эшби, Федорова, Бейеринка и бобовый агар).

Для выделения и изучения устойчивых признаков колониально-морфологических вариантов, а также их стабильности использовали метод предельных разведений с последующим высевом глубинным способом на ряд специфических питательных сред (табл. 2) (Теппер, 2004; Практикум по микробиологии, 2005).

Таблица 2

Среды, используемые для выделения диссоциантов бактериальных штаммов

Штамм	Набор питательных сред
<i>Bacillus cereus</i> AI <i>Bacillus firmus</i> SDS-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• МПА</li> <li>• КАА</li> <li>• Для эндоспорообразования</li> <li>• Для цистоподобных рефрактерных форм</li> <li>• Для получения стационарных клеток</li> <li>• Сбалансированная по солевому составу среда, но лимитированная по азоту и фосфору (Р и N – 0,2 и 1,0 г/л)</li> <li>• МПА с содержанием NaCl – 4,0; 7,0 и 10,0 %</li> </ul>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> XI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• МПА</li> <li>• КАА</li> <li>• Migula</li> <li>• Кинга В</li> <li>• Сбалансированная по солевому составу среда, но лимитированная по азоту (6,0; 11,0 и 22,0 г/л) и фосфору (0,55, 0,3 и 1 г/л)</li> <li>• МПА с содержанием NaCl – 0,5; 1,0 и 2,0 %</li> </ul>
<i>Staphylococcus xylosus</i> SK	<ul style="list-style-type: none"> <li>• МПА</li> <li>• ЖСА</li> <li>• Селективная среда для стафилококков</li> </ul>

Определение литических свойств бактерий (протеолитических и амилолитических) осуществляли в соответствии с общепринятыми методиками (Руководство к практическим занятиям по микробиологии, 1983; Практикум по микробиологии, 2005).

### **Определение деструкционной способности исследуемых штаммов.**

Определение способности бактериальных штаммов трансформировать нефть осуществляли количественным методом измерения массовой доли нефтепродуктов на анализаторе жидкости «Флюорат-02» (Другов и др., 2000). Параллельно с этим осуществляли определение титра и состав диссоциантов в культуральной жидкости путем высева на селективные агаризованные среды оптимальные для каждого штамма.

### **Определение фитотоксичности исследуемых культур микроорганизмов.**

Фитотоксичность исследуемых культур бактерий оценивали биотестом с помощью семян кукурузы и кресс-салата. Степень фитотоксичности штаммов определяли по ростовым эффектам: количеству проросших семян и длине проростков и корней (Берестецкий, 1982; Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991).

Результаты экспериментов обрабатывали общепринятыми методами математической статистики, выражали в виде графиков и таблиц с помощью пакета программы Microsoft Excel 2007, использовали текстовый редактор Microsoft Word 2007.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **1. Скрининг и идентификация штаммов бактерий, обладающих углеводородокисляющей активностью**

**Выделение углеводородокисляющих микроорганизмов из нефтезагрязненных экосистем.** В результате проведенных исследований установлено, что в составе микрофлоры нефтезагрязненных почв и почво-грунтов Прикаспийской Низменности преобладают следующие рода углеводородокисляющих бактерий: *Bacillus*>*Arthrobacter*>*Rhodococcus*>*Acinetobacter*>*Pseudomonas*>*Micrococcus*>*Staphylococcus*. Бактериальные ассоцианты циано-бактериальных сообществ вод Северного Каспия представлены бациллярными формами.

Всего из исследуемых образцов методом накопительных микробных культур выделено 64 бактериальных штамма углеводородокисляющих микроорганизмов.

На основе изучения окислительных и эмульгирующих свойств установлено, что выделенные чистые культуры бактерий обладают не только способностью использовать жидкие нефтяные углеводороды, но и достаточно высокой

эмульгирующей активностью (до 60,9 %). На основе этих данных отобрано 5 наиболее активных штаммов бактерий, использующих нефть в качестве единственного источника углерода и энергии: из почво-грунтов нефтебазы, расположенной в черте города Астрахани - штаммы X1 и M1, из нефтезагрязненных почв Республики Калмыкия – штамм A1, из циано-бактериального сообщества вод Северного Каспия – штаммы 4-1/4-2.

**Идентификация наиболее активных углеводородокисляющих бактериальных штаммов** путем секвенирования фрагментов гена 16S рРНК позволила идентифицировать тестируемые штаммы следующим образом: A1 - *Bacillus cereus*; X1 - *Pseudomonas aeruginosa*; M1 - *Staphylococcus xylosus*; 4-1/4-2 идентичны - *B. firmus*.

**Изучение потребностей исследуемых бактериальных штаммов в источниках углерода и азота.** При изучении исследуемых штаммов использовать различные источники углерода (Теппер, 2004; Практикум по микробиологии, 2005) установлено, что данные штаммы бактерий различаются по культурально-морфологическим свойствам, то есть способны к диссоциации внутри однородной микробной популяции. Различия в виде колоний обычно выявляются не на любой плотной среде, а только на богатой углеводами. Различия на клеточном уровне выражаются в способе расхождения делящихся клеток (образуются либо цепочки клеток, лежащие на прямой, как у R-вариантов, либо расположенные под углом одна к другой V-образные формы, как у S- и M-вариантов) (Нетрусов, 2006).

Все исследуемые штаммы характеризуется широким спектром поглощения различных углеводов (табл. 3) и способны расти на предложенных средах, применяемых для изучения потребности бактерий в молекулярном азоте (Теппер, 2004; Нетрусов, 2005), при этом у них наблюдается образование H-типа диссоциантов.

Таким образом, при изучении штаммов *B. cereus A1*, *B. firmus SDS-1*, *Ps. aeruginosa X1* и *St. xylosus SK* использовать различные соединения углерода и молекулярный азот, была выявлена способность диссоциировать на морфотипы (R, S, M и H-тип). В связи с этим, возникает необходимость изучения гетерогенности исследуемых бактериальных культур.

Культурально-морфологическая изменчивость исследуемых бактериальных штаммов, возникающая при росте на средах с различными источниками углерода

штамм	Источник углерода												
	арабиноза	ксилоза	манит	сорбит	рамноза	глюкоза	дульцит	галактоза	раффиноз	лактоза	сахароза	мальтоза	крахмал
<i>B. cereus A1</i>	-	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R
<i>B. firmus SDS-1</i>	-	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R
<i>Ps. aeruginosa X1</i>	M	-	R	M	M	R	M	M	M	M	M	M	R
<i>St. xylosus SK</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

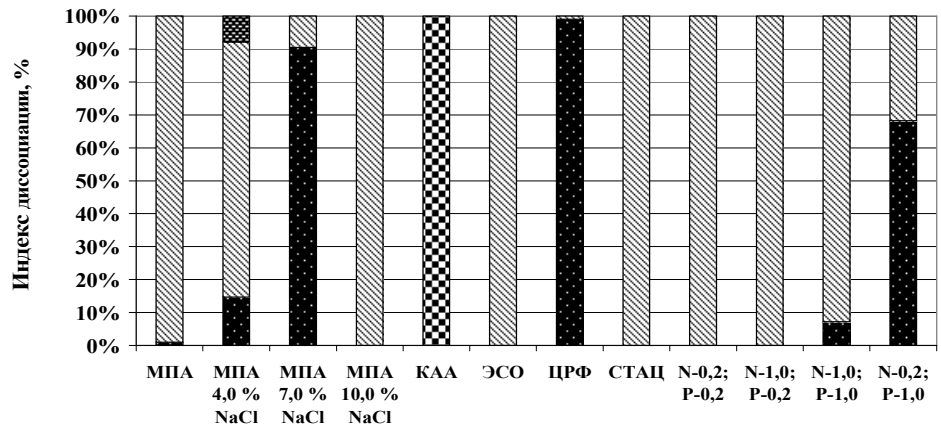
## 2. Выделение и изучение диссоциантов углеводородокисляющих бактерий

**Выделение и изучение диссоциантов исследуемых бактерий.** Для выделения и изучения диссоциативных вариантов микробной популяции использовался метод предельных разведений с последующим высевом глубинным способом на ряд специфических для каждого вида бактерий питательных сред (Практикум по микробиологии, 2005).

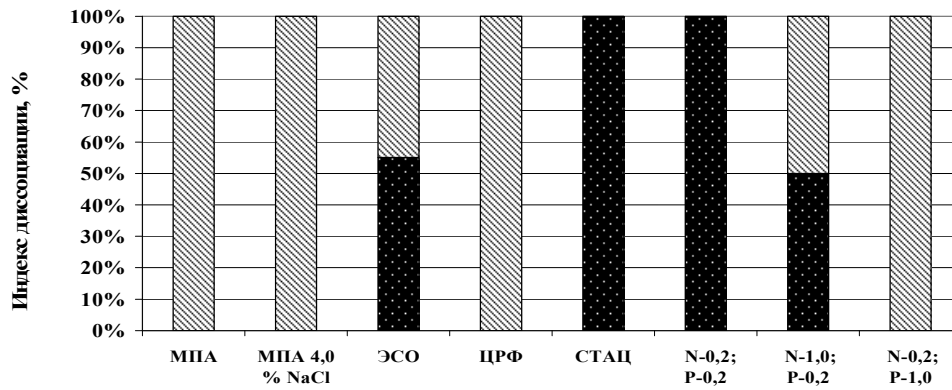
В популяции штамма *B. cereus A1* отмечены диссоциативные переходы 4-х типов, которые по способности расщепляться на различные варианты располагаются в следующей последовательности: S>R>H>M (рис. 1а). В результате исследований получено 26 диссоциантов. Наличие спор обнаружено у S-форм, выделенных на средах богатых органикой и минеральными веществами, а также у диссоциантов выросших на среде с 4,0 % NaCl.

При изучении явления гетерогенности штамма *B. firmus SDS-1* получено 14 диссоциантов, обладающих диссоциативными переходами 2-х типов (S>R) (рис. 1б). Для штамма *B. firmus SDS-1*, в отличие от *B. cereus A1*, отмечено отсутствие роста при культивировании на КАА, МПА с повышенным содержанием NaCl (7,0 и 10,0 %) и среде с высоким содержанием азота и фосфора (1,0 г/л). Наличие спор для диссоциантов *B. firmus SDS-1* характерно для всех S- и R-вариантов, выделенных на большинстве сред, за исключением МПА с 4,0 % NaCl и среде для образования ЦРФ.

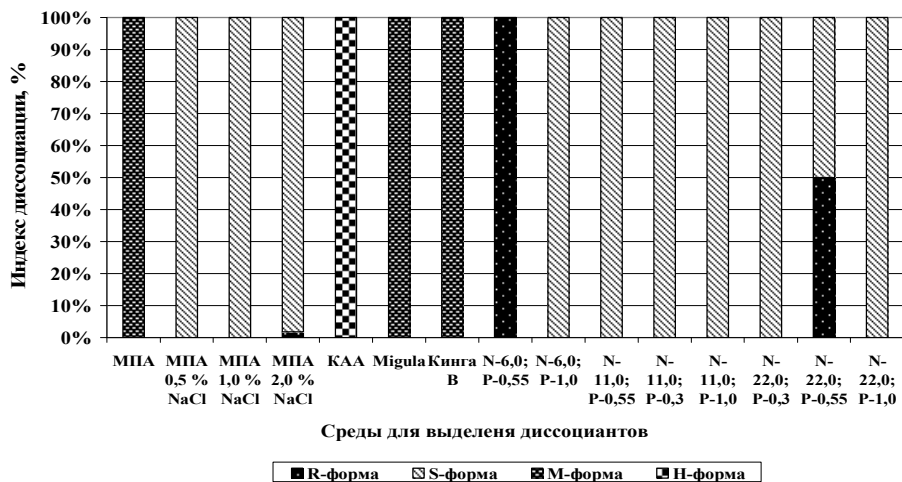
В целом, для штаммов *B. cereus A1* и *B. firmus SDS-1* характерно практически одинаковое количество R- и S-типов диссоциантов (рис. 1а, 1б).



а)



б)



в)

Рис. 1. - Индексы диссоциации исследуемых штаммов: а) *B. cereus AI*; б) *B. firmus SDS-1*; в) *Ps. aeruginosa XI*.

Для популяции штамма *Ps. aeruginosa XI* отмечены диссоциативные переходы 4-х типов, располагающиеся в следующей последовательности: S>M>R>H (рис. 1в). В результате исследований выделен 21 диссоциант.

При выделении диссоциантов отмечено, что фосфор является одним из сильных селективирующих факторов. Избыток фосфора в среде с углеводами способствует увеличению S-варианта в популяции *B. cereus A1*, *B. firmus SDS-1* и *Ps. aeruginosa XI*.

Изучение культурально-морфологической изменчивости показало, что исследуемые штаммы бактерий по способности расщепляться на различные варианты располагаются в следующей последовательности: *Ps. aeruginosa XI*>*B. cereus A1*>*B. firmus SDS-1*>*St. xylosus SK*. Таким образом, наиболее устойчивым является штамм *St. xylosus SK* для которого не обнаружено диссоциативных переходов, существует только одна S-форма на всех вариантах сред.

**Изучение литических свойств диссоциантов.** При изучении амилолитической активности диссоциантов *B. cereus A1* установлено, что полный гидролиз крахмала осуществляют S-формы, до декстринов – R-формы; *B. firmus SDS-1* – полный гидролиз – R-форма, а частичный – S-форма; *Ps. aeruginosa XI* – полный и частичный гидролиз S-формы. Для диссоциантов штамма *St. xylosus SK* не обнаружено наличия амилолитической активности. На основе исследования протеолитической активности установлено, что диссоциантов *B. cereus A1*, способных усваивать казеин в качестве субстрата можно расположить в следующей последовательности: S>R>MH; *Ps. aeruginosa XI* - S>M>RH. Для всех трех диссоциантов штамма *St. xylosus SK*, выделенных на МПА, ЖСА и селективной среде для стафилококков, отмечено наличие слабой протеолитической активности. Диссоцианты штамма *B. firmus SDS-1* не обладают протеолитической активностью.

**Изучение способности диссоциантов расти на твердой среде с сырой нефтью и нефтепродуктами.** Способность диссоциантов исследуемых культур использовать жидкие нефтяные углеводороды, определенная методом Егорова, показала активность усвоения углеводородов всеми диссоциантами бактерий. Однако, у разных типов диссоциантов внутри одного штамма эта активность выражена в разной степени. Установлено, что наибольшую способность усваивать

нефтяные углеводороды, в том числе «жесткие» нефтепродукты проявляет S-форма штаммов *B. cereus A1*, *Ps. aeruginosa X1*, *St. xylosus SK* и R-форма штамма *B. firmus SDS-1*.

**Определение эмульгирующей активности.** Для определения эмульгирующей способности выделенных диссоциантов исследуемых бактериальных штаммов их культивировали на специфической минеральной среде в течение суток. Для получения супернатанта культуральной жидкости ее центрифугировали при 6000 об/мин в течение 15 минут. После чего к 4 мл исследуемого супернатанта в качестве гидрофобного субстрата добавляли 4 мл керосина и встряхивали в течение 10 минут. Изменение индекса эмульгирования определяли через 24 ч как величину отношения высоты эмульсионного слоя к общей высоте жидкости в пробирке и выражали в процентах.

В результате проведенных исследований установлено, что источники питания влияют на способность продуцировать внеклеточные метаболиты, обладающие эмульгирующими свойствами у исследуемых культур.

Бактерии рода *Bacillus* характеризуются средними показателями индекса эмульгирующей способности. У S-варианта штамма *B. cereus A1*, выделенного на среде с высоким содержанием азота и фосфора, максимально этот показатель составляет 37,7%, а у R-типа штамма *B. firmus SDS-1*, выделенного на среде для стационарных форм - 31,37 %.

Максимальная эмульгирующая способность штамма *Ps. aeruginosa X 1* характерна для S-типа диссоцианта (52,31 %), изолированного на среде с максимальным содержанием азота (2,2 г/л) и средним – фосфора (0,055 г/л).

Для всех трех диссоциантов штамма *St. xylosus SK* характерно наличие эмульгирующей активности. Наибольший индекс эмульгирования (23,99 %) отмечен у диссоцианта, выделенного на ЖСА.

Таким образом, экспериментальное изучение активности роста чистых культур в присутствии нефти и нефтепродуктов, а также эмульгирующей активности показало, что различные диссоцианты имеют разную активность в отношении углеводородов. Так, наиболее стабильные результаты показали диссоцианты S-типа штаммов *Ps. aeruginosa X1*, *B. cereus A1*, полученные на средах по дефициту азота и фосфора (N-22,0; P-0,55 и N-1,0; P-1,0 соответственно),

*St. xylosus SK* (МПА) и R-типа штамма *B. firmus SDS-1* (на среде для стационарных форм), что позволило их выбрать как самые активные для дальнейших исследований.

### **3. Изучение процесса биодеструкции нефти исследуемыми бактериальными штаммами**

Следующей задачей нашего исследования являлось **изучение процесса биодеструкции нефти наиболее активными вариантами штаммов исследуемых бактерий** в лабораторных модельных экспериментах на основании количественного определения содержания нефти в системах с внесением культур бактерий и определения титра и состава диссоциантов в культуральной жидкости.

При постановке опытов использовали пенициллиновые флаконы, в которые вносили жидкую среду оптимального состава, культуру исследуемых штаммов бактерий и 2,0 % сырой стерильной нефти. В качестве контроля использовали модельные системы без внесения нефти. Продолжительность опыта составила 10 суток.

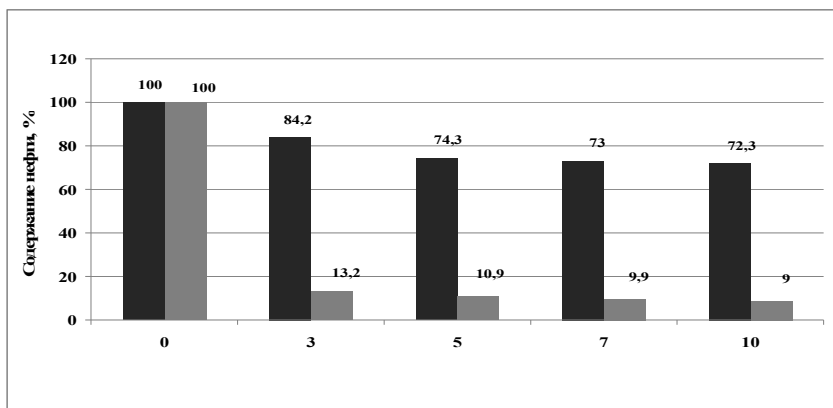
В эксперименте использовали культуры бактерий находящиеся в стационарной фазе роста: *St.xylosus SK*, *Ps.aeruginosa XI* - 4 часа; *B.firmus SDS-1*, *B.cereus A1* – 8 часов.

Проведенные исследования показали, что на протяжении всего эксперимента изменение содержания нефти в системах в процессе экспозиции напрямую зависит от изменения численности микроорганизмов и их способности распадаться на диссоциативные варианты.

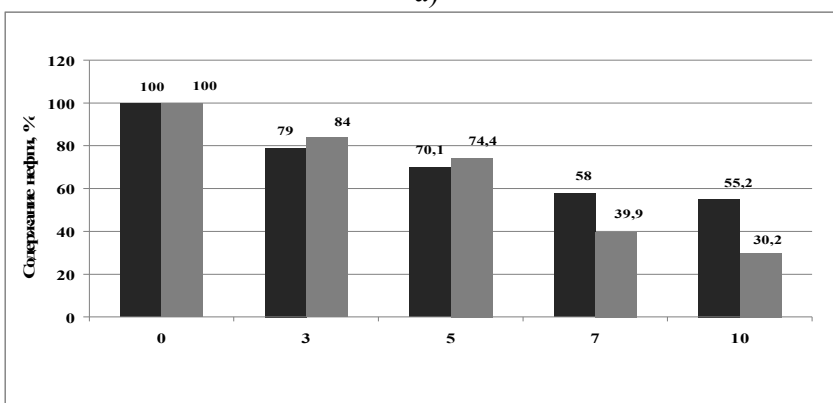
Максимальная убыль нефти за 10 суток эксперимента (91%) наблюдалась при внесении штамма *St.xylosus SK*. При этом за 3-е суток эксперимента убыль нефти составила 86,3% (рис. 2а). Для клеток бактериального штамма отмечено отсутствие диссоциативных переходов (рис. 3а).

Убыль нефти при внесении штаммов *B.cereus A1* и *Ps.aeruginosa XI* практически одинакова (69,8% и 74,0% соответственно) (рис. 2б, 2в). Ранее, при культивировании данных штаммов бактерий на селективных средах было отмечено, что они являются наиболее подверженными популяционной вариабельности, которая выражается в их способности распадаться на 26 и 21 тип диссоциантов соответственно.

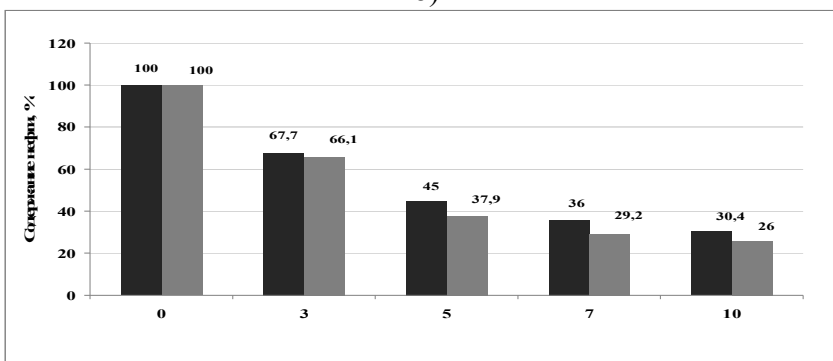




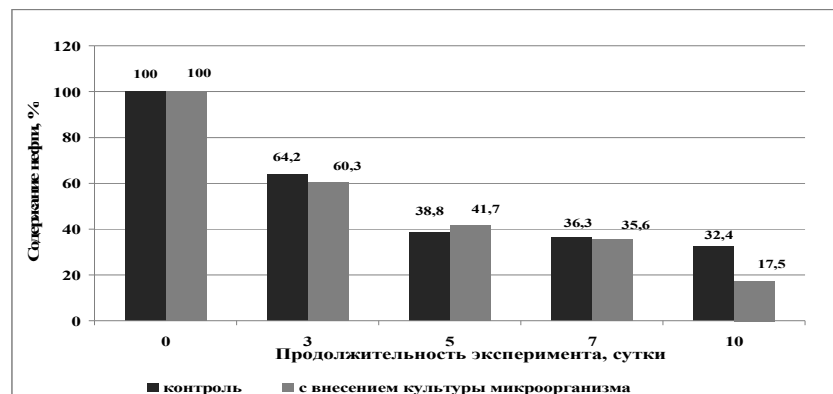
а)



б)

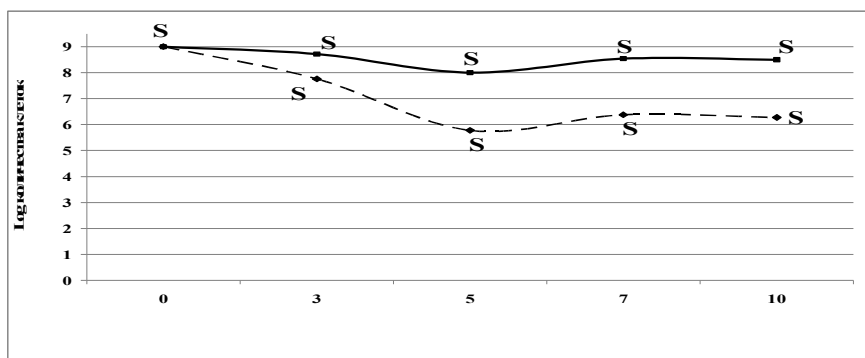


в)

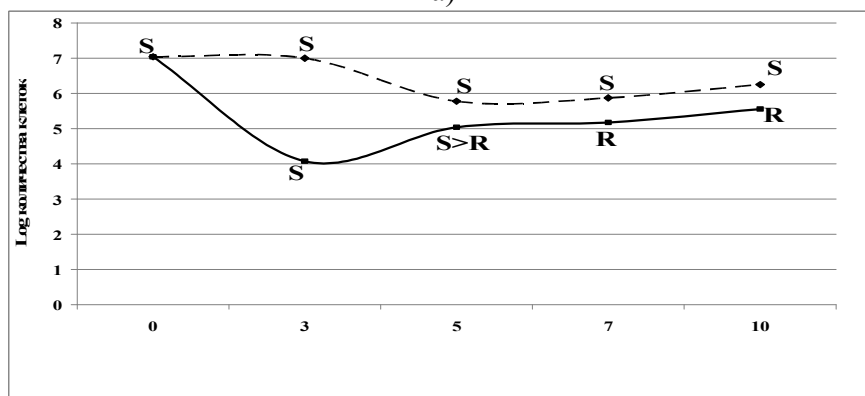


г)

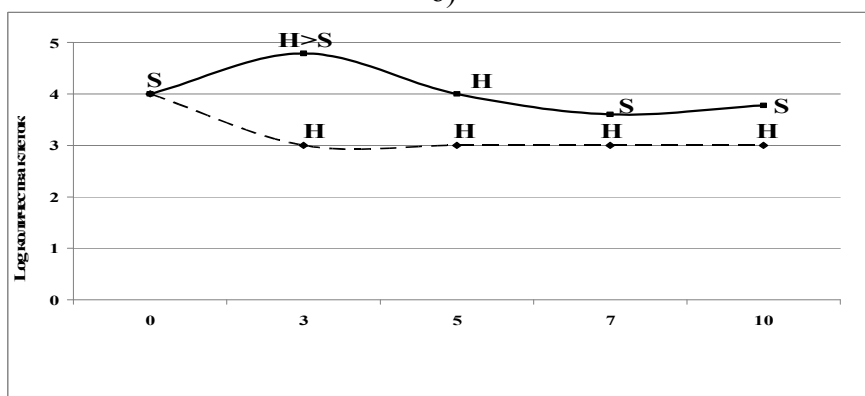
Рисунок 2. - Динамика убыли нефти в эксперименте при внесении: а) *St. xylosus SK*; б) *B. cereus A1* в) *Ps. aeruginosa X1* г) *B. firmus SDK-1*.



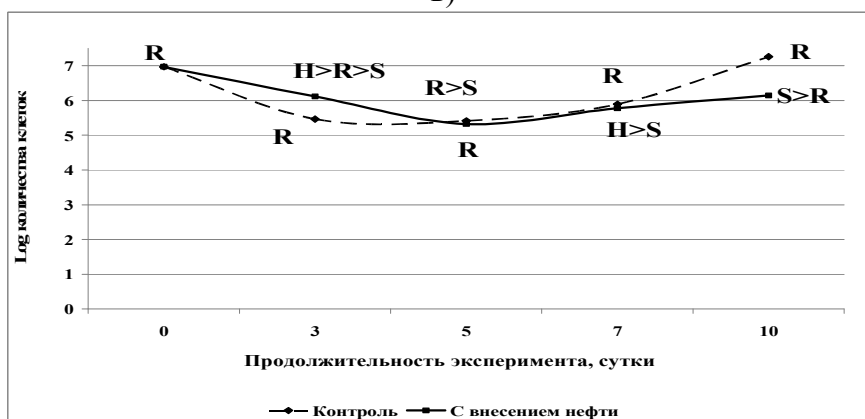
а)



б)



в)



г)

Рисунок 3. - Динамика численности клеток в эксперименте при внесении: а) *St.xylosus SK* б) *Ps. aeruginosa X1*; в) *B. cereus A1*; г) *B. firmus SDK-1*.

Возможно, их нестабильность проявляется и на биохимическом уровне, чем и объясняется их низкая деструкционная активность в отношении нефтяных углеводов.

Для бактерий штамма *Ps. aeruginosa X1* наибольшее снижение нефтяных углеводов (62,1%) отмечено на 5-е сутки экспонирования (рис. 2в), когда происходит увеличение численности клеток после резкого снижения в течение первых 3-х суток (на 3 порядка) и преобладанием в популяции S-варианта. В дальнейшем при доминировании R-формы снижение содержания нефти не столь весомое, хотя и происходит дальнейший рост численности микроорганизмов (рис. 3б).

Бактерии рода *Bacillus* характеризуются различным отношением к нефтяным углеводородам, что выражается в особенностях кинетики роста и фенотипической изменчивости штаммов (рис. 3в, 3г). Для штамма *B. cereus A1* значительное снижение суммарных нефтяных углеводов (60,1%) наблюдается к 7 суткам эксперимента (рис. 3в) при смене популяции на S-морфотип. При культивировании штамма *B. firmus SDK-1* на среде с нефтью на 3-и и 5-е сутки опыта обнаружено доминирование в популяции H-типа диссоциантов (рис. 3г), образование которого ранее не происходило при культивировании на специфических средах, что, однако не влияет на деструкционную активность данного штамма (рис. 2г). Убыль нефти при доминировании H-формы в течение 7-и суток опыта составила 58,3%, в целом за 10 суток эксперимента - 82,5%.

Таким образом, на основе проведенных исследований установлено, что исследуемые штаммы бактерий по способности деградации сырой нефти располагаются в следующей последовательности: *St. xylosus SK* (91,0%) > *B. firmus SDS-1* (82,5%) > *Ps. aeruginosa X1* (74,0%) > *B. cereus A1* (69,8%). Показано, что фенотипическая изменчивость оказывает влияние на активность штаммов. Наибольшей деструкционной способностью обладает штамм *St. xylosus SK* для которого не обнаружено расщепления бактериальной популяции на диссоциативные варианты.

**Изучение фитотоксичности бактериальных штаммов.** Известно, что штаммы микроорганизмов, являющиеся перспективными для процессов биоремедиации нефтезагрязненных экосистем должны быть нетоксичными для

живых организмов (Вельков, 2001). В связи с этим провели изучение токсичности исследуемых штаммов бактерий на семенах кукурузы и кресс-салата, так как растения особенно чувствительны к факторам внешней среды в ранние периоды роста, когда прорастает семя и формируется проросток (Логинов, 2005).

Оценку фитотоксичности штаммов *B. cereus* A1, *B. firmus* SDS-1, *Ps. aeruginosa* X1 и *St. xylosus* SK осуществляли по методу Берестецкого (Берестецкий, 1982). Для оценки степени токсичности использовали суспензии культур микроорганизмов с титром  $10^7$  КОЕ/мл.

Семена тест-культуры (кукурузы и кресс-салата) проращивали в течение 8 суток во влажных камерах на фильтровальной бумаге с добавлением 20 мл воды и 1 мл исследуемых бактериальных суспензий при постоянной температуре. В качестве контроля использовали семена кукурузы и кресс-салата, не обработанные культуральной суспензией.

Наличие в испытуемом образце фитотоксинов определяли по проценту проросших семян кукурузы и кресс-салата.

В процессе исследования воздействия суспензии микроорганизмов на прорастание семян кукурузы были обнаружены различия между штаммами по признаку токсигенности. Однако, ни один из исследуемых штаммов полностью не подавлял прорастание семян растений (рис. 4 а-б).

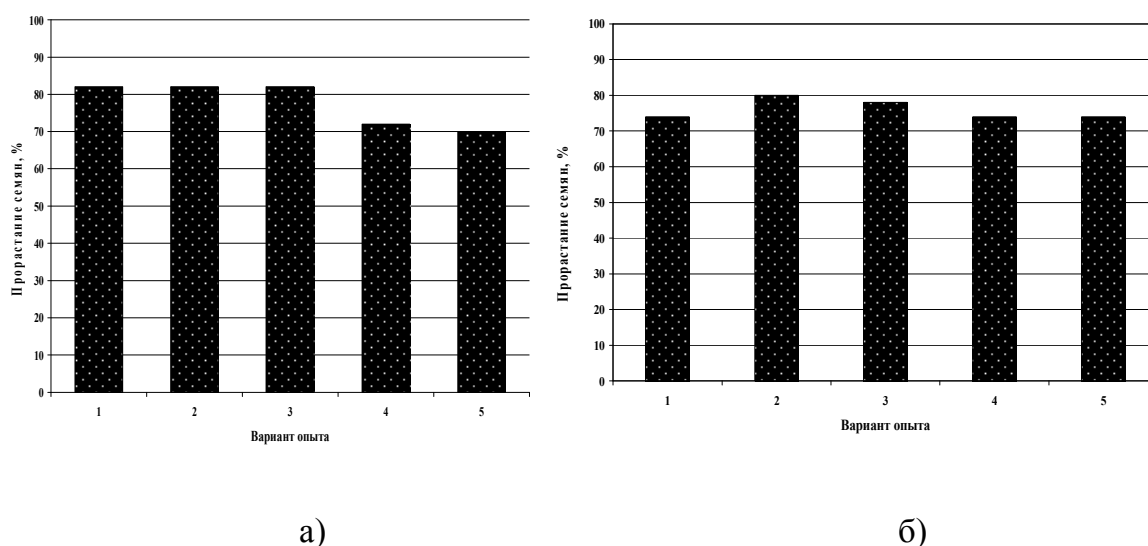


Рисунок 4. – Оценка токсичности исследуемых штаммов по проращиванию семян (%): а) кукурузы; б) кресс-салата (1 – контроль; 2 – *B.cereus* A1; 2 - *B.firmus* SDS-1; 3 - *Ps.aeruginosa* X1; 4 - *St.xylosus* SK).

Таким образом, на основании проведенных нами исследований по изучению эмульгирующей и деструкционной активности, а также фитотоксичности выделенные штаммы бактерий *B. firmus SDS-1* и *St. xylosus SK*, можно рекомендовать для разработки бактериальных препаратов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные технологии биоремедиации нефтезагрязненных экосистем основаны, главным образом, на применении бактериальных препаратов, эффективность применения которых определяется специфическими свойствами штамма-деструктора и жизнеспособностью клеток, однако, она может снижаться за счет появления в популяции неактивных форм, то есть диссоциантов. Поэтому, для получения биомассы интродуцируемых микроорганизмов необходимо поддержание культур в лабораторных условиях с сохранением их деструктивной активности, что может достигаться путем контроля микробной популяции на культурально-морфологическом и биохимическом уровне.

В связи с этим провели изучение фенотипической изменчивости бактериальных штаммов *Bacillus cereus A1*, *Bacillus firmus SDS-1*, *Pseudomonas aeruginosa X1*, *Staphylococcus xylosus M1*, выделенных из нефтезагрязненных экосистем Прикаспийской низменности. Изучение явления диссоциации показало, что исследуемые штаммы бактерий по способности расщепляться на различные варианты располагаются в следующей последовательности: *Ps. aeruginosa X1* > *B. cereus A1* > *B. firmus SDS-1* > *St. xylosus SK*, что влияет на их активность в отношении нефтяных углеводов. Наибольшей деструкционной способностью (91,0%) обладает штамм *St. xylosus SK* для которого не обнаружено расщепления бактериальной популяции на диссоциативные варианты.

Совокупность положительных результатов по изучению эмульгирующей и деструкционной активности, фитотоксичности исследуемых штаммов показала, что наиболее активными из всех исследованных являются штаммы *St. xylosus SK* и *B. firmus SDS-1*, использующие нефтяные углеводороды в качестве источника питания и энергии в диапазоне солености 0,0-2,4% и 0,0-10,0% NaCl соответственно, что указывает на их галотолерантность. Таким образом, депонированные в ВКПМ штаммы *St. xylosus SK* (№В-9278) и *B. firmus SDS-1* (№В-

9884), можно рекомендовать для разработки бактериальных препаратов, используемых в условиях Прикаспийской низменности.

### ВЫВОДЫ

1. Из исследованных нефтезагрязненных экосистем Прикаспийской низменности выделено 64 штамма бактерий, обладающих углеводородокисляющей активностью, относящиеся к родам: *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*.

2. При изучении способности выделенных чистых культур микроорганизмов использовать нефтяные углеводороды в качестве единственного источника углерода, отобрано 4 наиболее активных штамма, идентифицированные как *Bacillus cereus A1*, *Bacillus firmus SDS-1*, *Pseudomonas aeruginosa X1*, *Staphylococcus xylosus M1*.

3. При изучении фенотипической диссоциации на питательных средах, различающихся по своему компонентному составу, получено 26 колониально-морфологических варианта штамма *B. cereus A1*, 14 – *B. firmus SDS-1*, 21 – *Ps. aeruginosa X1* и 3 – *St. xylosus SK*. По способности расщепляться на различные варианты исследуемые штаммы располагаются в следующей последовательности: *B. cereus A1* - S>R>H>M; *B. firmus SDS-1* - S>R и *Ps. aeruginosa X1* - S>M>R>H; *Staphylococcus xylosus SK* S-форма, что свидетельствует о способности к диссоциации кокковых форм бактерий только на биохимическом уровне, и отсутствием на культурально-морфологическом.

4. Изучение углеводородокисляющей и эмульгирующей активности бактериальных культур позволило подобрать оптимальные питательные среды для получения наиболее устойчивых диссоциантов для проявления максимальной активности в отношении нефтяных углеводородов: S-типы *B. cereus A1*, *Ps. aeruginosa X1* и *St. xylosus SK*, полученные на средах по дефициту азота и фосфора (N-1,0; P-1,0 и N-22,0; P-0,55 соответственно) и МПА; R-тип *B. firmus SDS-1*, полученный на среде для стационарных форм.

5. Все исследуемые бактериальные штаммы обладают способностью разлагать углеводороды сырой нефти и по активности располагаются в следующей последовательности: *St. xylosus SK* (91%)>*B. firmus SDS-1* (82,5%)>*Ps. aeruginosa X1* (74,0%)>*B. cereus A1* (69,8%). Наиболее активные и устойчивые к

фенотипической изменчивости штаммы *St. xylosus SK* и *B. firmus SDS-1* можно рекомендовать в качестве основы биопрепаратов для деградации нефтяных углеводов.

#### **СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:**

1. Сангаджиева О.С., Ключаева М.А., Сопрунова О.Б. О возможности активизации биодеструкции нефтяных углеводов // Южно-Российский вестник геологии, географии и глобальной энергии. Научно-технический журнал №3. Изд-во АГУ, 2003, С. 197-198.

2. Сангаджиева О.С., Ключаева М.А., Сопрунова О.Б. Экспериментальное изучение биологической очистки нефтезагрязненных почв накопительной микробной культурой // Экологические системы и приборы, 2004, № 11, С. 12-15.

3. Сангаджиева О.С., Ключаева М.А., Сопрунова О.Б. Углерододокисляющие микроорганизмы нефтезагрязненных почв Республики Калмыкия // Материалы Международной научно-практической конференции: «Проблемы и перспективы реабилитации техногенных экосистем». 20-24 сентября 2004г. Астрахань: изд-во АГТУ, 2005г., С. 101-104.

4. Ключаева М.А. Экспериментальное изучение процессов биодegradации нефтяных углеводов в почвах накопительной микробной культурой // Сборник научных студенческих работ: «Биотехнология – охране окружающей среды». М.: Изд-во ООО «Графикон-принт», 2005, С. 212-215.

5. Ключаева М.А., Сопрунова О.Б. Углерододокисляющие микроорганизмы нефтезагрязненных почв аридной зоны // Материалы Международной научной конференции: «Экология и биология почв: проблемы диагностики и индикации». Ростов-на-Дону: Ростиздат, 2006, С. 256-257.

6. Ключаева М.А. Углерододокисляющие микроорганизмы почв аридной зоны // Сборник тезисов 10-ой Пущинской школы конференции молодых ученых, посвященной 50-летию Пущинского научного центра РАН: «Биология - наука XXI века». Пущино, 17-21 апреля 2006г., С. 230-231.

7. Ключаева М.А. Углерододокисляющие бактерии почв аридной зоны // Сборник тезисов Международной школы конференции посвященной 100-летию со дня рождения С.И. Алиханяна: «Генетика микроорганизмов и биотехнология». Москва-Пущино, 28 ноября-1 декабря 2006г., С. 128-129.

8. Ключаева М.А., Сопрунова О.Б. Управление структурой сообществ бактериальных диссоциантов как перспективный подход повышения эффективности биоремедиации // Материалы Четвертого Московского Международного конгресса: «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, 12-16 марта 2007г., М.: ЗАО «Экспо-биохимтехнологии», РХТУ и Д.И. Менделеева, 2007. часть 2, С. 115.

9. Сопрунова О.Б., Ключаева М.А. Штаммы деструкторы нефтяных углеводов // Вестник АГТУ. науч.журн. 1(36)/2007 январь-февраль. С. 180-183. (принята в печать 1 марта 2006 г.).

10. Сопрунова О.Б., Ключаева М.А. Эколого-физиологические особенности бактериальных штаммов, изолированных из нефтезагрязненных экосистем Нижнего Поволжья // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе, 2008, № 5. – С. 64-68.

11. Ключаева М.А., Сопрунова О.Б. Фенотипическая изменчивость бактерий как фактор регуляции биотехнологических процессов // Сборник тезисов Международной школы конференции посвященной 40-летию создания института ГосНИИГенетика: «Генетика микроорганизмов и биотехнология». Москва-Пущино, 20-24 октября 2008г., С. 140-141.

12. Ключаева М.А. Морфо-физиологическая изменчивость бактерий как фактор регуляции биотехнологических процессов // Материалы международной научно-практической конференции: «Фундаментальные аспекты биологии в решении актуальных экологических проблем». – Астрахань, 2008. – С. 111-115.

13. Ключаева М.А. Перспективы использования аборигенной микрофлоры для разработки эффективных природоохранных технологий // Сборник тезисов докладов 1-ой открытой научно-практической конференции молодых работников Газопромыслового управления ООО «Газпром добыча Астрахань». – Астрахань, типография «Факел», 2009. – С.60-61.

14. Заявка на выдачу патента № 2009107427 (20/009939), заявл. 20.02.2009 г. «Штамм *Bacillus firmus* SDS-1 для деградации нефтяных углеводородов» / Сопрунова О.Б., Гальперина А.Р., Ключаева М.А.