УДК 579.66

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ МОРСКИХ БАКТЕРИЙ PSEUDOALTEROMONAS CITREA, PSEUDOALTEROMONAS ELYAKOVII И OCEANIPHAERA LITORALIS

[1,2]Богатыренко Е.А., [1,2]Бузолева Л.С., [3]Репина М.А., [1]Братенши А.А.

[1]Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, e-mail: jokonda@mail.ru;
[2]ФГБУ НИИЭМ им. Г.П. Сомова СО РАМН, Владивосток;
[3]ФГУП «СахНИРО», Южно-Сахалинск

Исследована способность штаммов бактерий *Pseudoalteromonas citrea, Pseudoalteromonas elyakovii* и *Oceanisphaera litoralis,* выделенных из прибрежных вод о. Сахалин, к биодеградации различных нефтеуглеводородов. Наибольший эффект для всех штаммов наблюдали в пробах, содержащих бензиновую фракцию нефти, что обусловливает возможность их применения при ликвидации нефтяных загрязнений, содержащих бензиновые фракции. Скорость утилизации углеводородов под действием данных микроорганизмов изменяется в ряду: ароматические углеводороды > парафиновые углеводороды (с большим числом атомов углерода) > низкомолекулярные алканы. Отмечена выраженная специфичность при деградации нефтеуглеводородов у исследуемых штаммов. Так, *Pseudoalteromonas citrea* принимает активное участие в процессах разрушения высокомолекулярных компонентов нефти и нефтепродуктов, а *Oceanisphaera litoralis* обладает наибольшей окислительной способностью в отношении отработанного дизельного масла. Очевидно, что для более эффективного процесса ремедиации морской среды в случае нефтяного загрязнения целесообразно совместное применение этих штаммов.

Ключевые слова: биоремедиация, нефтеуглеводороды, морские бактерии, деструкторы

INVESTIGATION SONOILOXIDIZING CAPACITY OF MARINE BACTERIA PSEUDOALTEROMONAS CITREA, PSEUDOALTEROMONAS ELYAKOVII AND OCEANIPHAERA LITORALIS

[1,2] Bogatyrenko E.A., [1,2]Buzoleva L.S., [3]Repina M.A., [1]Bratenshi A.A.

[1]Far Eastern Federal University, Vladivostok, e-mail: jokonda@mail.ru;
[2]Research institute of epidemiology and microbiology n.a. G.P. Somov, Vladivostok;
[3]Sakhalin research institute of fishery and oceanography, Yuzhno-Sakhalinsk

The ability of bacteria strains *Pseudoalteromonas citrea*, *Pseudoalteromonas elyakovii* and *Oceanisphaera litoralis* isolated from coastal waters of the Island of Sakhalin to biodegradation of various petrohydrocarbons is investigated. The highest result for all strains observed in the tests containing petrol fraction of oil that causes possibility of their application for elimination of the oil pollution containing petrol fractions. Speed of utilization of hydrocarbons under the influence of these microorganisms changes among: aromatic hydrocarbons > paraffin hydrocarbons (with a large number of carbon atoms) > low-molecular alkanes. The expressed specificity is noted for degradation of petrohydrocarbons by studied strains. So, *Pseudoalteromonas citrea* takes active part in processes of destruction of high-molecular components of oil and oil products, and *Oceanisphaera litoralis* possesses the greatest oxidizing ability concerning the fulfilled diesel oil. It is obvious joint application of these strains is necessary for more effective process of remediation of the marine environment in case of oil pollution.

Keywords: bioremediation, petrohydrocarbons, marine bacteria, destructors

Одним из наиболее перспективных способов решения проблемы загрязнения морских акваторий признана биоремедиация – комплекс методов очистки вод, грунтов и атмосферы с использованием метаболического потенциала биологических объектов, в том числе морских и пластовых микроорганизмов [9, 10].

При этом целесообразно выявление эндемичных форм микроорганизмов для каждой нефтегазоносной провинции [1, 8]. Реализация такого метода очистки требует выделения специфических штаммов микроорганизмов, а также определение их редукционной активности в процессах биодеградации нефтяных углеводородов (НУ) различных классов.

Целью настоящей работы являлось исследование способности морских микроорганизмов *Pseudoalteromonas citrea, Pseudoalteromonas elyakovii и Oceanisphaera litoralis,* выделенных из прибрежных вод о. Сахалин, к биодеградации нефтяных углеводородов с целью перспективного использования их в качестве деструкторов нефтяных загрязнений морской воды в этом регионе.

Материалы и методы исследования

Объекты исследования. Для проведения эксперимента были выбраны 3 штамма бактерий: *Pseudoalteromonas citrea, Pseudoalteromonas elyakovii* и *Oceanisphaera litoralis,* взятые из коллекции лаборатории экологии патогенных бактерий НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, которые оказались наиболее устойчивыми из всех исследуемых изолятов к 2%

концентрации нефти (флотский мазут и сырая сахалинская нефть) в среде МКД [6].

Приготовление образца, содержащего стандартную смесь НУ. В стерильные колбы, содержащие 180 мл синтетической минеральной среды МКД, вносили 20 мл стандартной смеси УВ (табл. 1) и суспензию соответствующего штамма микроорганизмов. Количество клеток составило примерно 1 млрд кл. в 200 мл жидкой среды МКД. Колбы инкубировали при температуре 20°С в режиме освещения 12/12 в течение 3-х недель.

Таблица 1

Содержание УВ в стандартной смеси

№ п/п	УВ	Концентрация УВ в стандартной смеси, мг/л
1	i-Тридекан	90,8
2	p-Ксилол	103,3
3	Гексадекан	92,8
4	Гептан	193,2
5	Нафталин	240,0
6	Толуол	52,0

Приготовление модельных сред. Было приготовлено три образца модельного загрязнения морской воды нефтепродуктами: модель бензинового загрязнения (нефтяной дистиллят с интервалом кипения 100–160°С), модель загрязнения окисленными нефтяными остатками (нефтяная фракция с температурой кипения более 200°С) и модель масляного загрязнения (отработанное моторное масло М-10 (г. Ангарск), степень выработки > 80%). Интерпретацию результатов производили по отношению к контрольному образцу, не содержащему микроорганизмов.

Количественное определение углеводородов. Суммарное содержание НУ в исследуемых пробах определяли гравиметрическим методом по общепринятой методике [2, 3, 5]. Для дифференцированного определения летучих УВ использовали метод ГЖХ-МС согласно РД 52.24.473–95 [4]. Идентификацию хроматографических пиков проводили по времени удерживания и масс-спектру (электронная библиотека масс-спектров NIST 98). Количество УВ оценивали по площади пика методом калибровочного графика.

Изменение состава тяжелой масляной фракции исследовали также методом ИК-спектроскопии. Интерпретацию спектров проводили по совокупности полос поглощения соответствующих групп, опираясь на справочные данные [7].

Степень деградации УВ определяли по отношению количества УВ в объеме пробы в последние сутки эксперимента к исходному количеству соответствующих УВ.

Результаты исследования и их обсуждение

Существенное уменьшение концентрации углеводородов в морской воде помимо процессов биодеструкции связано с процессами фотоокисления, испарением легких углеводородов и т.п. Для объективного исследования процесса биодеградации необходимо учитывать все эти процессы. С этой целью было определено содержание индивидуальных углеводородов стандартной смеси на 9-е, 14-е и 20-е сутки в искусственной морской воде, не содержащей микроорганизмов. Результаты показали закономерное снижение содержания всех компонентов смеси (табл. 2). Дальнейшие расчеты изменения концентраций углеводородов стандартной смеси под действием исследуемых штаммов микроорганизмов производили с учетом степени деградации каждого УВ на соответствующие сутки эксперимента.

Таблица 2

Изменение содержания УВ в контрольной пробе без внесения микроорганизмов

№ п/п	Компонент смеси	Содержание углеводородов, в % от внесенного количества		
		9 сутки	14 сутки	20 сутки
1	i-Тридекан	86 ± 16	75 ± 14	55 ± 10
2	p-Ксилол	83 ± 16	76 ± 15	60 ± 11
3	Гексадекан	90 ± 18	75 ± 14	68 ± 13
4	Гептан	95 ± 19	70 ± 13	47 ± 8
5	Нафталин	67 ± 13	52 ± 9	38 ± 7
6	Толуол	85 ± 16	67 ± 13	58 ± 10

Для изучения специфического действия микроорганизмов на отдельные углеводороды штаммы *Ps. citrea,Ps. elyakovii и O. litoralis* высевали в минеральную среду МКД, содержащую стандартную смесь УВ. Результаты (табл. 3–5) показали высокую деструктивную активность всех изучаемых штаммов в отношении углеводородов различных классов, причем наибольшая скорость процесса наблюдалась для ароматических компонентов смеси.

Таблица 3

Содержание УВ в элективной среде МКД
в присутствии штамма микроорганизмов *Ps. Citrea*

№ п/п	Название УВ	Количество УВ, % (9 сутки)	Количество УВ, % (14 сутки)	Количество УВ, % (20 сутки)
1	i-Тридекан	Следовые количества*	0	0
2	p-Ксилол	0	0	0
3	Гексадекан	13 ± 3	Следовые количества	0
4	Гептан	93 ± 18	53 ± 9	40 ± 7
5	Нафталин	5 ± 1	0	0
6	Толуол	0	0	0

Примечание. * – менее 5% площади хроматографического пика.

Таблица 4

Содержание УВ в элективной среде МКД
в присутствии штамма микроорганизмов *Ps. elyakovii*

№ п/п	Название УВ	Количество УВ, % (9 сутки)	Количество УВ, % (14 сутки)	Количество УВ, % (20 сутки)
1	i-Тридекан	Следовые* количества	0	0
2	p-Ксилол	0	0	0
3	Гексадекан	13 ± 3	Следовые количества	0
4	Гептан	93 ± 18	53 ± 9	40 ± 7
5	Нафталин	5 ± 1	0	0
6	Толуол	0	0	0

Примечание. * – менее 5% площади хроматографического пика.

Таблица 5

Содержание УВ в элективной среде МКД
в присутствии штамма микроорганизмов *Oc. litoralis*

№ п/п	Название УВ	Количество УВ, % (9 сутки)	Количество УВ, % (14 сутки)	Количество УВ, % (20 сутки)
1	i-Тридекан	10 ± 2	5 ± 2	Следовые количества*
2	p-Ксилол	10 ± 2	0	0
3	Гексадекан	7 ± 1	5 ± 1	Следовые количества*
4	Гептан	70 ± 13	45 ± 8	40 ± 7
5	Нафталин	15 ± 3	Следовые количества*	0
6	Толуол	0	0	0

Примечание. * – менее 5% площади хроматографического пика.

Исследование изменения углеводородного состава модельных образцов нефтяных загрязнений различной природы под воздействием исследуемых микроорганизмов позволило выявить высокую деструктивную активность последних в отношении нефтяного субстрата. При этом наибольший эффект наблюдали в пробах, содержащих бензиновую фракцию нефти. Деградация бензина за 17 суток в среднем составила от 80 до 96%, что обусловливает возможность их применения при ликвидации нефтяных загрязнений, содержащих бензиновые фракции. Из всех используемых штаммов наибольшей способностью к деградации (88 ± 2)% обладал штамм *Ps. citrea*.

Исследование качественного состава образцов бензинового загрязнения методом статического парофазного анализа с ГЖХ-МС-окончанием показало, что скорость утилизации углеводородов под действием данных микроорганизмов изменяется в ряду: ароматические углеводороды > парафиновые углеводороды (с большим числом атомов углерода) > низкомолекулярные алканы.

Общее исследование изменения углеводородного состава образцов, содержащих отработанное дизельное масло,

показало, что наибольшей окислительной способностью в этом случае обладает штамм *Oceanisphaera litoralis*. При этом уменьшение содержания дизельного масла за 17 суток составило 63 ± 10 %.

Также была исследована способность микроорганизмов к окислению тяжелых масляных фракций нефти ($t_{вык}$ > 200 °C). Исследование процессов утилизации подобного субстрата под действием микроорганизмов имеет большое практическое значение. Это связано с тем, что природные процессы самоочистки поверхностных вод представляют собой сложную систему физико-химических, химических и биохимических преобразований загрязняющих веществ органической природы, приводящих к образованию высокомолекулярных гетероциклических полимерных структур, близких по строению к смолистым компонентам и асфальтеновым структурам нефти. Таким образом, высококипящие фракции нефти могут служить модельным компонентом продуктов глубокого окисления загрязнителей антропогенной природы, в том числе нефти и нефтепродуктов.

Наибольшая степень деградации фракции нефти с $t_{вык}$ > 200 °C наблюдалась в присутствии штамма *Ps. citrea* (72 ± 12 %). В этом случае была предпринята попытка исследования изменения качественного состава образца методом ИК-спектроскопии. Результаты показали наличие характерных пиков в области (2800–3000 и 1600 см$^{-1}$). Вероятно, это связано с появлением водородных и двойных связей, т.е. образованием спиртовых групп и ненасыщенных углеводородов как продуктов метаболизма микроорганизмов и промежуточных процессов окисления НУ, что достоверно доказывает участие штамма *Ps. citrea* впроцессах разрушения высокомолекулярных компонентов нефти и нефтепродуктов.

Заключение

Впервые для микроорганизмов видов *Pseudoalteromonas citrea, Pseudoalteromonas elyakovii* и *Oceanisphaera litoralis,* штаммы которых были выделены из прибрежной зоны о. Сахалин, показана их высокая деструктивная активность в отношении разложения различных классов нефтеуглеводородов. Наибольший эффект для всех штаммов наблюдали в пробах, содержащих бензиновую фракцию нефти, что обусловливает возможность их применения при ликвидации нефтяных загрязнений, содержащих бензиновые фракции.

Скорость утилизации углеводородов под действием данных микроорганизмов изменяется в ряду: ароматические углеводороды > парафиновые углеводороды (с большим числом атомов углерода) > низкомолекулярные алканы.

Следует отметить выраженную специфичность при деградации нефтеуглеводородов у исследуемых штаммов. Так, *Pseudoalteromonas citrea* принимает активное участие впроцессах разрушения высокомолекулярных компонентов нефти и нефтепродуктов, а *Oceanisphaera litoralis* обладает наибольшей окислительной способностью в отношении отработанного дизельного масла. Очевидно, что для более эффективного процесса ремедиации морской среды в случае нефтяного загрязнения целесообразно совместное применение этих штаммов.

Изучение биологических свойств исследуемых нефтеокисляющих микроорганизмов позволило показать механизмы деградации нефтеуглеводородов, выявить особенности штаммов нефтеокисляющих бактерий прибрежной зоны о. Сахалин, что представляет теоретический интерес. В то же время оценка их нефтедеградирующей способности имеет практическое значение для создания банка штаммов, перспективных для биоремедиации среды.

Список литературы

1. Кобзев Е.Н., Петрикевич С.Б., Шкидченко А.Н. Исследование устойчивости ассоциации микроорганизмов-нефтедеструкторов в открытой системе // Прикладная биохимия и микробиология. – 2001. – Т. 37, № 4. – С. 413–417.

2. Лурье Ю. Ю. Химический анализ производственных сточных вод. – М.: Химия, 1974. – 336 с.

3. РД 39-034-90 Методические указания. Гравиметрический метод определения нефтепродуктов в морских донных осадках. ВНИИморгео. НПО «Союзморинжгеология».

4. РД 52.24.473–95. Методические указания. Методика выполнения измерений массовой концентрации летучих ароматических углеводородов в водах газохроматографическим методом.

5. РД 52.24.476-2007 Массовая концентрация нефтепродуктов в водах. Методика выполнения измерений ик-фотометрическим методом.

6. Руководство по методам биологического анализа морской воды и донных отложений / под общ. ред. А.В. Цыбань. – Л.: Гидрометеоиздат, 1980. – 192 с.

7. Смит А. Прикладная ИК-спектроскопия / пер. с англ. Б.Н. Тарасевича. – М.: Мир, 1982. – 328 с.

8. Чугунов В.А., Ермоленко З.М., Жиглецова С.К., Мартовецкая И.И., Миронова Р.И., Жиркова Н.А., Холоденко В.П. Разработка и испытания биосорбента «Экосорб» на основе ассоциации нефтеокисляющих бактерий для очистки нефтезагрязненных почв // Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – Т. 36, № 6. – С. 661–665.

9. Tan N.C.G., Prenafeta-Boldu F.X., Opsteeg J.L., Lettinga G., Field J.A.Biodegradation of azo dyes in co cultures of anaerobic granular sludge with aerobic aramatic amine degrading enrichment cultures // Appl. Microbial. Biotechnol. – 1999. – Vol. 51. – P. 865–871.

10. Wackett L.P.Biodegradation of fuel components // Environmental Microbiology. – 2008. – Vol. 10, № 5. – P. 1380–1381.

References

1. Kobzev E.N., Petrikevich S.B., Shkidhenko A.N. Applied biochemistry and microbiology, 2001, Vol. 37, no 4, pp. 413–417.

2. Lurie U.U. Himicheskii analiz proizvodsvtennyh stochnyh vod [Chemical analysis of industrial sewage]. Moscow, Chemistry Publ., 1974. 336 p.

3. RD39-034-90 Metodicheskie ukazaniya. Gravimetricheskii metod opredeleniya nefteproduktov v morskih donnyh osadkah [Methodical instructions. Gravimetric method of definition of oil products in marine sediments]. VNI Imorgeo. NPO «Souzmorinzhgeolgiya».

4. RD 52.24.473–95. Metodicheskie ukazaniya. Metodika vypolneniya izmerenii massovoi kontsentratsii letuchih aromaticheskih uglevodorodov v vodah gazohromatographicheskim metodom [Methodica linstructions. Technique of measurements of mass concentration of flying aromatic hydrocarbons in waters by gas chromatography].

5. RD 52.24.476-2007 Massovaya kontsentratsiya nefteproduktov v vodah. Metodika vypolnenia izmerenii IK-fotometricheskim metodom [Mass concentration of oil products in waters. Technique of measurements by the infrared spectroscopy].

6. Rukovodstvo po metodam biologicheskogo analiza morskoi vody i donnyh otlozhenii [Guidetomethods of the biological analysis of marine water and sediments]. Under edition byTsyban A.V., Leningrad, Gidrometizdat,1980. 192 p.

7. Smit A. Prikladnaya I. K-spektrometriya [Appliedinfrared spectroscopy]. Translated fron eng. by Tarasevich B.N., Moscow, Mir, 1982. 328 p.

8. Chugunov V.A., Ermolenko Z.M., Zhigletsova S.K., Martovetskaya I.I., Mironova R.I., Zhirkova N.A., Holodenko V.P. Applied biochemistry and microbiology, 2000, Vol. 36, no. 6, pp. 661–665.

9. Tan N.C.G., Prenafeta-Boldu F.X., Opsteeg J.L., Lettinga G., Field J.A.Biodegradation of azo dyes in co cultures of anaerobic granular sludge with aerobic aramatic amine degrading enrichment cultures. Appl. Microbial. Biotechnol. 1999. Vol. 51. pp. 865–871.

10. Wackett L.P. Biodegradation of fuel components. Environmental Microbiology. 2008. Vol. 10, no. 5. pp. 1380–1381.

Рецензенты:

Мартынова А.В., д.м.н., профессор кафедры эпидемиологии и военной эпидемиологии, ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерство здравоохранения России, г. Владивосток;

Кузнецова Т.А., д.б.н., зав. лабораторией иммунологии, ФГБУ НИИЭМ им. Г.П. Сомова СО РАМН, г. Владивосток.

Работа поступила в редакцию 19.12.2013.