

## ПОИСК И ВЫЯВЛЕНИЕ НОВЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ С ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ В ТЕХНОГЕННЫХ СУБСТРАТАХ

©2011 Нгуен Виет Тиен, О.Б. Сопрунова

ФГУП «Астраханский государственный технический университе», г. Астрахань

Поступила 11.07.2011

Представлены результаты первичного скрининга бактериальных штаммов, обладающих полифункциональными свойствами. Показана способность использования бактериальными культурами анионных поверхностно-активных веществ.

**Ключевые слова:** *бактериальные штаммы, биоПАВ, биодegradация, анионные поверхностно-активные вещества.*

Нефть является наиболее распространенным источником топлива в мире и относится к наиболее токсичным загрязнителям окружающей природной среды. Несовершенство технологий добычи, транспортировки, переработки и хранения нефти приводит к ее значительным потерям [7]. Естественное самоочищение природных экосистем происходит обычно с недостаточно высокой скоростью, т.к. нефть и практически все нефтепродукты оказывают резкую депрессию функциональной активности водной и почвенной флоры и фауны, тем самым, исключая эти объекты из природопользования [11]. Разложение углеводородов обеспечивается прежде всего деятельностью углеводородокисляющих микроорганизмов, способных в конструктивном и энергетическом обмене окисгенировать углеводородные субстраты, минерализовать их до CO<sub>2</sub> и воды или превращать в соединения, утилизируемые другими группами микроорганизмов. В настоящее время установлено, что углеводородокисляющие микроорганизмы расселяются повсюду, где в экосистемах имеются газообразные или жидкие углеводороды [4].

Проблеме восстановления естественного состава загрязненных нефтью вод и почв посвящены многочисленные научные исследования и разработки: среди последних наиболее действенным способом считается искусственное введение в очищаемую среду специально подобранных штаммов микроорганизмов, способных в большей или меньшей степени ассимилировать саму нефть или продукты ее переработки [1,6]. Многие известные био-препараты, используемые для очистки воды и почвы от нефтяных загрязнений, созданы на основе монокультур бактерий того или иного типа.

Применение углеводородокисляющих штаммов микроорганизмов в конкретных регионах определяется соответствием ряда условий: воздействие на нефти конкретных месторождений; «уживаемость» с аборигенной микрофлорой очищаемой

среды; работа в определенных значениях pH среды, содержания солей, температурных интервалах применения; устойчивость к действию иных поллютантов, присутствующих в очищаемой среде [10]. Увеличению скорости очистки от нефтяных углеводородов способствует использование биологических поверхностно-активных веществ (био-ПАВ), активными продуцентами которых являются микроорганизмы [5]. Эмульгирование (солюбилизация) углеводородов с помощью ПАВ улучшает поступление гидрофобных органических загрязнителей из почв и воды в микробные клетки и, соответственно, их деградацию. Целью настоящих исследований являлось выделение микроорганизмов из техногенных субстратов (нефтьшламы и замазученные сточные воды), обладающих полифункциональными свойствами, способствующими повышению эффективности очистки нефтесодержащих производственных отходов.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Выделение микроорганизмов осуществляли методом накопительной микробной культуры на питательной среде СРУGG для гетеротрофных слизеобразующих бактерий [9] при температуре 22-25<sup>0</sup>C на качалке при 300 об/мин.

Межклеточный матрикс бактерий выявляли после контрастирования метиленовой синью по Лефлеру [9] на фиксированных препаратах.

Эмульгирующую способность культуральной жидкости чистых бактериальных культур определяли методом Купера [12] путем добавления к 4 мл исследуемой жидкости 4 мл керосина или бензина с последующим встряхиванием в течение 10 мин. Изменение индекса эмульсионного слоя к общей высоте жидкости в измерительной пробирке выражали в процентах.

Способность микроорганизмов деградировать АПАВ изучали флуориметрическим методом, который основан на экстракции хлороформом ионных пар АПАВ с красителем акридиновый желтый [8] и измерении концентрации АПАВ в полученном экстракте с помощью анализатора жидкости «Флюорат-02».

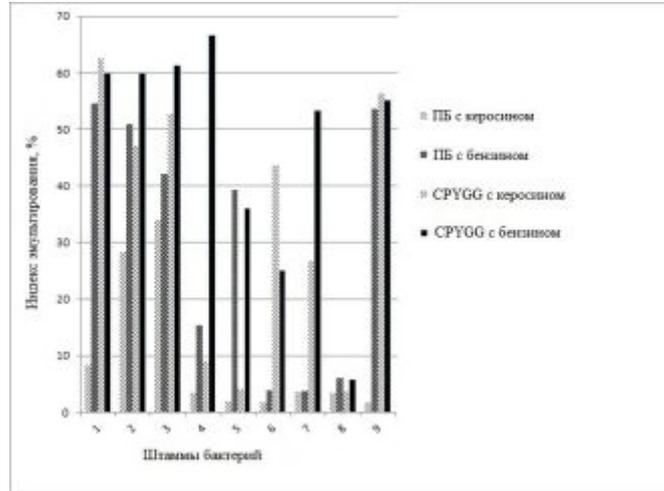
---

Нгуен Виет Тиен, e-mail: Viettien@yahoo.com, Сопрунова Ольга Борисовна, докт. биол. наук, проф., e-mail: soprunova@mail.ru

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

В результате первичного скрининга из нефтешламов и замазученных сточных вод выделено 9 слизиобразующих изолятов, представленных грамположительными бактериальными клетками и обладающих наиболее жидкой вязкой структурой. В результате экспериментальных исследований ус-

тановлено (рис. 1), что практически все исследуемые штаммы микроорганизмов обладают высокими эмульгирующими свойствами. При этом установлено, что культивирование штаммов на среде для слизиобразования способствует повышению эмульгирующей активности.



**Рис. 1.** Эмульгирующая способность исследуемых бактериальных штаммов.

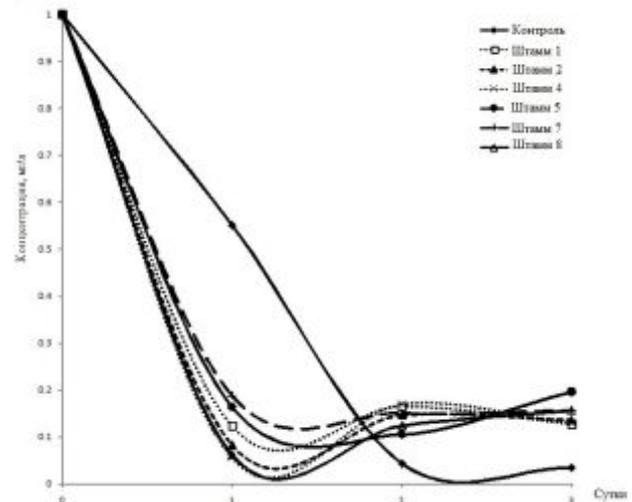
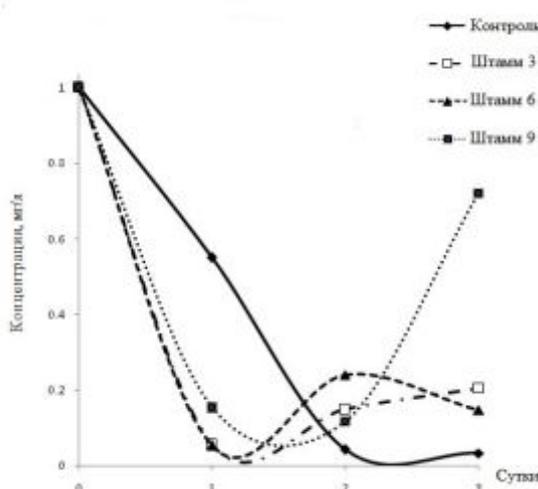
При изучении способности микроорганизмов деградировать АПАВ флуориметрическим методом использовали модельные растворы АПАВ следующих концентраций (мг/л): 1,0; 2,0; 10,0; 20,0. В данные растворы вносили бактериальные штаммы с титром клеток  $10^6$  КОЕ/мл.

В ходе экспериментальных исследований установлено, что все штаммы осуществляют деградацию АПАВ (рис. 2).

При этом отмечено, что максимальная убыль АПАВ с концентрацией 1,0 мг/л наблюдается в течение первых суток эксперимента во всех модельных растворах (рис. 2а). В модельных растворах

АПАВ с концентрацией 2,0 мг/л в первые сутки эксперимента максимальный эффект отмечен для штаммов 3, 5, 6, 8, 9 (рис. 2б). При концентрации АПАВ в модельных растворах 10,0 мг/л максимальная убыль ПАВ отмечена на 2-3 сутки эксперимента (рис. 2в), а при концентрации АПАВ в модельных растворах 20 мг/л – на 4-е сут (рис. 2г).

Таким образом, все исследуемые бактериальные штаммы способны деградировать АПАВ, скорость деградации при этом определяется метаболической активностью бактерий и концентрацией вносимого субстрата.



а

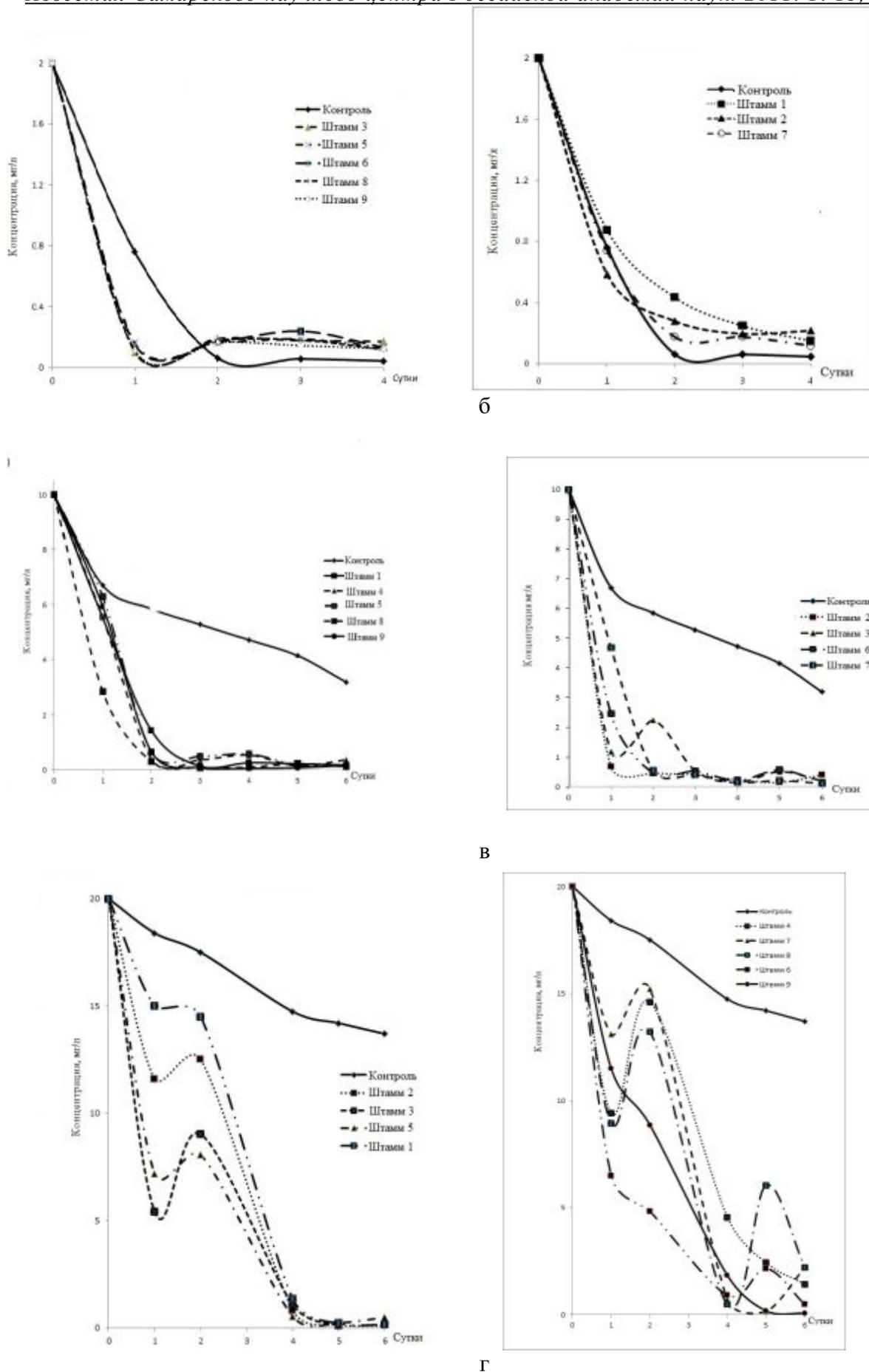


Рис. 2. Деградиционная способность исследуемых штаммов: а) концентрация АПАВ 1 мг/л; б) концентрация АПАВ 2 мг/л; в) концентрация АПАВ 10 мг/л; г) концентрация АПАВ 20 мг/л.

Следует отметить, что в ходе исследований практически во всех модельных растворах наблюдается незначительное повышение содержания АПАВ на различных этапах эксперимента. Вероятно, данное явление обусловлено способностью изучаемых бактериальных штаммов к синтезу био-ПАВ, т.к. бактерии, обладают способностью к образованию связанных и не связанных с клетками поверхностно-активных веществ (ПАВ), содержание которых зависит от состава среды, природы используемого источника углерода и обеспеченности культуры кислородом [2, 3].

Таким образом, в ходе исследований из промышленных отходов выделены новые штаммы слизеобразующих бактерий, обладающие эмульгирующей активностью и способные использовать анионные поверхностно-активные вещества в качестве источников питания, что позволяют сделать вывод о возможности использования данных бактериальных изолятов для разработки способов очистки от нефтяных углеводородов, поверхностно-активных веществ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вельков В.В. Биоремедиация: принципы, проблемы, подходы // Биотехнология. 1995. № 3-4. С. 70-76.
2. Гоготов И.Н., Ходаков Р.С. Образование поверхностно-активных веществ бактерией *Rhodococcus erythropolis* sH-5 при росте на разных источниках углерода // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 2. С. 207-212.
3. Гоготов И.Н., Мирошников А.И. Влияние состава ростовой среды и физико-химических факторов на образование ПАВ бактериями *Vacillus licheniformis* ВКМ В-511 // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 6. С. 654-658.
4. Исмаилов Н.М. Микробиологическая и ферментативная активность нефтезагрязненных почв // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М.: Наука, 1988. 254 с.
5. Карпенко Е.В. Перспективы использования бактерий рода *Rhodococcus* и микробных поверхностно-активных веществ для деградации нефтяных загрязнений // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. № 2. С. 175-179.
6. Коронелли Т.В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводов в окружающей среде // Прикладная биохимия и микробиология. 1996. Т. 32. № 6. С. 579-585.
7. Петрикевич С.Б., Кобзев Е.Н., Шкидченко А.Н. Оценка углеводородоксилирующей активности микроорганизмов // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 1. С. 25-30.
8. ПНД Ф 14.1:2.4.158-2000 Методика выполнения измерений массовой концентрации анионных поверхностно-активных веществ (АПАВ) в пробах природной, питьевой и сточной воды флуориметрическим методом на анализаторе жидкости «Флюорат-02»: Утв. 2000-03-15. М., 2000. 21 с.
9. Сохань Т.С., Дзянь Чжан, Ботвинко И.В., Нетрусов А.И. Поиск новых бактериальных экзополисахаридов для нефтегазового комплекса // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. 2008. № 5. С. 62-64.
10. Стабникова Е.В., Селезнева М.В., Рева О.Н., Иванов В.Н. Выбор активного микроорганизма-деструктора углеводородов для очистки нефтезагрязненных почв // Прикладная биохимия и микробиология. 1995. Т. 31. № 5. С. 534-539.
11. Чугунов В.А., Ермоленко З.М. Создание и применение жидкого препарата на основе ассоциации нефтеокисляющих бактерий // Прикладная биохимия и микробиология. 2000. Т. 36. № 6. С. 666-671.
12. Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species // Applied and Environmental Microbiology. 1987. V. 53. № 2. P. 224-229.

#### SEARCH AND REVEALING OF NEW BACTERIAL STRAINS WITH MULTIFUNCTIONAL PROPERTIES IN TECHNOGENIC SUBSTRATES

©2011 Nguen Viet Tien, O.B. Soprunova

Astrakhan State Technical University, Astrakhan

In given article results of primary screening bacterial strains, possessing multifunctional properties are presented. Ability to use is shown by bacterial cultures of anionic surface-active substances.

**Key words:** bacterial strains, biopeahens, biodegradation, anionic surface-active substances.