

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОТБОР МИКРООРГАНИЗМОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ЭКОСИСТЕМ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

Файзулина Э.Р., Татаркина Л.Г., Спанкулова Г.А., Баймаханова Г.Б.,
Айткельдиева С.А., Смирнова И.Э., Уразова Ж.К.

*Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы,
e-mail: elmira_f@mail.ru*

Для очистки окружающей среды от органических токсичных загрязнителей в чрезвычайно суровых условиях перспективными с биотехнологической точки зрения являются экстремофильные микроорганизмы из-за способности к адаптации к экстремальным условиям и уникальных защитных механизмов. Целью данного исследования были выделение и отбор экстремофильных микроорганизмов, способных эффективно разлагать углеводороды нефти. Из экстремальных экосистем Казахстана было выделено 496 изолятов. Проведен скрининг по способности выделенных микроорганизмов расти в условиях высокой засоленности среды и при повышенных значениях pH и температуры. Установлено, что большинство изолятов росли на среде с 5% NaCl. С увеличением солености до 10–25% количество изолятов, выдерживающих такие концентрации, снижалось. Практически все солетолерантные изоляты были адаптированы к щелочным условиям (pH8), однако более высокие значения pH выдерживало меньшее количество культур. Более половины солетолерантных культур показали способность к росту при 40°C. При повышении температуры до 50°C рост наблюдался только у 30 изолятов, а до 60°C – у 5 изолятов. Изучена способность солетолерантных и алкалофильных культур расти на нефти как единственном источнике углерода и энергии. В результате было отобрано 13 микроорганизмов с высокой нефтеокисляющей активностью, перспективных для биоремедиации нефтезагрязненных экосистем в экстремальных условиях.

Ключевые слова: экстремальные экосистемы, нефтеокисляющие микроорганизмы, деградация нефти, соленость, pH среды, температура

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант AP19677718).

ISOLATION AND SELECTION OF MICROORGANISMS PROMISING FOR BIOREMEDIATION OF OIL-POLLUTED ECOSYSTEMS IN EXTREME CONDITIONS

Faizulina E.R., Tatarkina L.G., Spankulova G.A., Baimakhanova B.G.,
Aitkeldiyeva S.A., Smirnova I.E., Urazova Zh.K.

*Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty,
e-mail: elmira_f@mail.ru*

Extremophilic microorganisms are promising from a biotechnological point of view for the purification of the environment from organic toxic pollutants in extremely harsh conditions, due to their ability to adapt to extreme conditions and unique defense mechanisms. The aim of this study was to isolate and select extremophilic microorganisms capable of effectively degrading petroleum hydrocarbons. 496 isolates were isolated from extreme ecosystems of Kazakhstan. Screening was carried out for the ability of the isolated microorganisms to grow in conditions of high salinity and elevated pH values and temperature. It was found that most isolates grew on a medium with 5% NaCl. With an increase in salinity to 10–25%, the number of isolates withstanding such concentrations decreased. Almost all salt-tolerant isolates were adapted to alkaline conditions (pH8) but fewer cultures could withstand higher pH values. More than half of the salt-tolerant cultures showed the ability to grow at 40°C. When the temperature increased to 50°C, growth was observed only in 30 isolates, and at 60°C – in 5 isolates. The ability of salt-tolerant and alkaliphilic cultures to grow on oil as the only source of carbon and energy was studied. As a result, 13 microorganisms with high oil-oxidizing activity were selected, promising for bioremediation of oil-polluted ecosystems in extreme conditions.

Keywords: extreme ecosystems, oil-oxidizing microorganisms, oil degradation, salinity, pH of environment, temperature

The study was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (grant AP19677718).

Введение

Загрязнение окружающей среды углеводородами природного и антропогенного происхождения является серьезной экологической проблемой. Особенно остро

данная проблема стоит перед странами, добывающими, транспортирующими и перерабатывающими нефть [1]. В настоящее время большое внимание уделяется разработке экологически безопасных техноло-

гий реабилитации природных сред, загрязненных сырой нефтью и нефтепродуктами. Большое внимание привлекает микробная биоремедиация как перспективная технология, которая может преодолеть недостатки используемых в настоящее время физико-химических методов. Она представляет собой универсальную технологию с высокой стабильностью, экономичностью и экологичностью [2, 3].

До последнего времени загрязнению и биоразложению нефтяных углеводородов в экстремальных условиях уделялось очень мало внимания. Однако многие загрязненные экосистемы характеризуются высокими или низкими температурами, экстремально кислым или щелочным pH, высоким давлением или высокой соленостью.

Как и все природные экосистемы на нашей планете, гиперсоленые среды подвержены экологическому загрязнению. Часто они загрязнены большим количеством нефтяных углеводородов. Нефтяная промышленность образует огромное количество нефтесодержащих и соленых остаточных вод (нефтесодержащие рассолы, производственные воды) с минерализацией до 10% и более после отделения сырой нефти от пластовой воды [4].

Применение микробных технологий для обработки загрязненной среды с высокой соленостью или колеблющейся соленостью ограничено из-за пагубного воздействия соли на микробную жизнь, включая разрушение клеточной мембраны, денатурацию ферментов, низкую растворимость кислорода, низкую растворимость углеводородов и высыхание [5]. Поэтому биоремедиация соленых сред без дорогостоящего разбавления соленой почвы и воды требует галофильных или галотолерантных организмов, которые переносят высокие концентрации солей. Эти микроорганизмы относятся к бактериям, актиномицетам и археям и способны утилизировать алифатические и (или) ароматические углеводороды [6, 7].

pH среды также является одним из факторов, влияющих на биоремедиацию нефтезагрязненных экосистем. Кислотность окружающей среды влияет на такие процессы, как транспорт через клеточную мембрану и баланс каталитических реакций, а также на активность ферментов. Уровень pH может сильно варьировать, и его необходимо учитывать при совершенствовании методов биологической очистки [8].

Из-за способности к адаптации к экстремальным условиям и уникальных защитных механизмов экстремофильным микроорганизмам уделяется все больше внимания. Они обладают надежными ферментатив-

ными и биокаталитическими системами, что делает их подходящими для эффективного удаления загрязняющих веществ из окружающей среды в чрезвычайно суровых условиях. Однако в настоящее время они все еще являются менее изученными группами, которые обладают большим биотехнологическим потенциалом [9].

Целью данного исследования были выделение и отбор экстремофильных микроорганизмов, способных эффективно разлагать углеводороды нефти.

Материалы и методы исследований

Объектами исследований служили микроорганизмы, выделенные из почвенных образцов экстремальных экосистем Казахстана. Отбор почвенных образцов выполняли в соответствии с ГОСТ-17.4.4.02-2017 [10] с соблюдением правил асептики.

Выделение микроорганизмов проводили путем посева из накопительных культур на питательный агар с 1% NaCl. Выросшие морфологически различные колонии проверялись на чистоту истощающим посевом и затем отсеивались на скошенный питательный агар. Изучение роста выделенных изолятов при разной засоленности среды проводили на питательном агаре, содержащем 50–250 г/л NaCl. Изучение роста выделенных изолятов при разных значениях pH проводили на питательном агаре. Для получения pH 8–10 среду подщелачивали 10%-ным раствором NaHCO₃. Чашки инкубировали в термостате при температуре 30°C в течение 3–5 суток.

Способность изолятов деградировать нефть изучали в жидкой модифицированной минеральной среде ВД следующего состава, г/л: NH₄NO₃ – 1,0, K₂HPO₄ – 1,0, KH₂PO₄ – 1,0, MgSO₄ – 0,2, CaCl₂×6H₂O – 0,02, FeCl₃ – следы, NaCl – 10,0, pH = 7,0–7,2. В колбы со 100 мл среды вносили по 5 мл суспензии клеток каждой исследуемой культуры и добавляли по 1 мл нефти месторождения Кумколь. Колбы инкубировали в термостатируемых шейкерах при температуре 30°C в течение 14 суток. Количественное определение остаточного содержания нефти в среде проводили гравиметрическим методом.

Статистическую обработку результатов исследований проводили по общепринятым критериям вариационно-статистического анализа с вычислением средних величин (M), ошибки средней арифметической (m) с помощью пакета компьютерных программ Microsoft Excel, 2010. Оценку статистической значимости различий средних величин проводили по стандартной методике [11]. Статистически значимыми считали различия при p<0,05.

Результаты исследований и их обсуждение

Соленость является одним из основных факторов, определяющим состав и функции микробного сообщества. При изменении солености наблюдается общий сдвиг как микробной структуры, так и метаболической активности [12]. Из экстремальных экосистем Казахстана в Атырауской, Мангистауской и Павлодарской областей было отобрано 15 образцов почвы. Из отобранных почвенных образцов на питательном агаре было выделено 496 изолятов. Изучен их рост на питательной среде с разным содержанием соли (5–25%). Результаты исследования показали, что большинство полученных изолятов были солетолерантными, на среде с 5% NaCl росло 384 культуры (рис. 1). С увеличением солености их

количество значительно уменьшилось. Так, при 10%-ном содержании соли рост показала половина выделенных культур, при 15%-ном – 20,4%, при 20%-ном – 13,9% выделенных изолятов. При концентрации NaCl 25% росли только 7 изолятов.

Одним из факторов, влияющих на микробную активность, является pH среды. Как правило, оптимальный уровень pH для роста бактерий составляет от 6 до 8 [8]. Авторами был изучен рост выделенных изолятов в щелочных условиях (pH 8, 9, 10). Для эксперимента были отобраны культуры, выдерживающие 5% NaCl.

Как видно из рисунка 2, при pH 8 из 384 изолятов росли практически все. Более высокие значения pH выдерживало меньшее количество культур. Так, при pH 9 рост показали 243 изолята, а при pH 10 – 158.

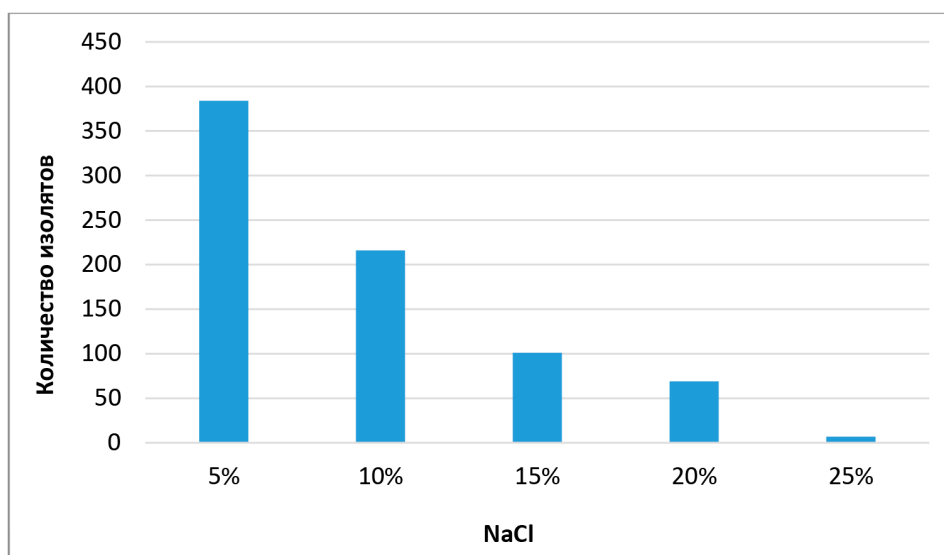


Рис. 1. Рост выделенных изолятов при разной солености среды

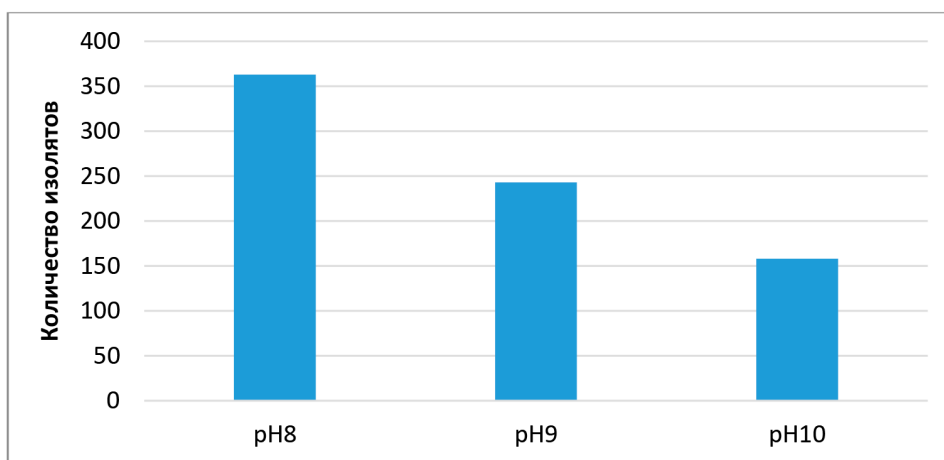


Рис. 2. Рост выделенных изолятов при разных значениях pH среды

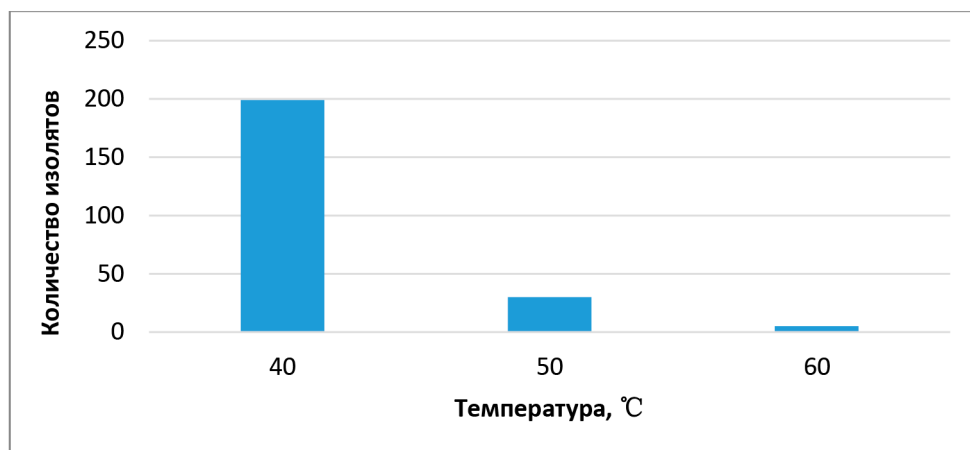


Рис. 3. Рост выделенных изолятов при повышенной температуре культивирования

Среди выделенных культур, растущих при pH 10, 106 изолятов выдерживали концентрацию NaCl 10%, 44 изолята – 15% и 22 изолята – 20%. Среди культур, выдерживающих 25%-ную концентрацию соли, 2 изолята росли при pH 8 и 9, остальные – в нейтральных условиях.

Изучен рост выделенных культур при повышенных температурах (40°C, 50°C и 60°C). Результаты исследования показали, что при 40°C росло 199 изолятов (рис. 3). С увеличением температуры количество термотолерантных микроорганизмов значительно снизилось. Так, при 50°C рост наблюдался только у 30 изолятов, а при 60°C – у 5 изолятов. Следует отметить, что большинство термотолерантных микроорганизмов выдерживали концентрацию NaCl 100 г/л и pH 10. Пять изолятов рос-

ли при 15%-ном содержании NaCl в среде и два изолята – при 20% NaCl.

На следующем этапе была изучена способность выделенных изолятов расти на нефти как единственном источнике углерода и энергии. С этой целью отобранные изоляты культивировали на минеральной среде с 1% нефтью месторождения Кумколь. Результаты исследования показали, что не все микроорганизмы-экстремофилы способны расти в минеральной среде с нефтью как единственным источником углерода и энергии. Только 45 изолятов в разной степени утилизировали углеводороды нефти. При их культивировании нефть видоизменялась: структура становилась мелкодисперсной или образовывалась эмульсия (рис. 4). В ряде случаев на поверхности среды оставалась тонкая нефтяная пленка.

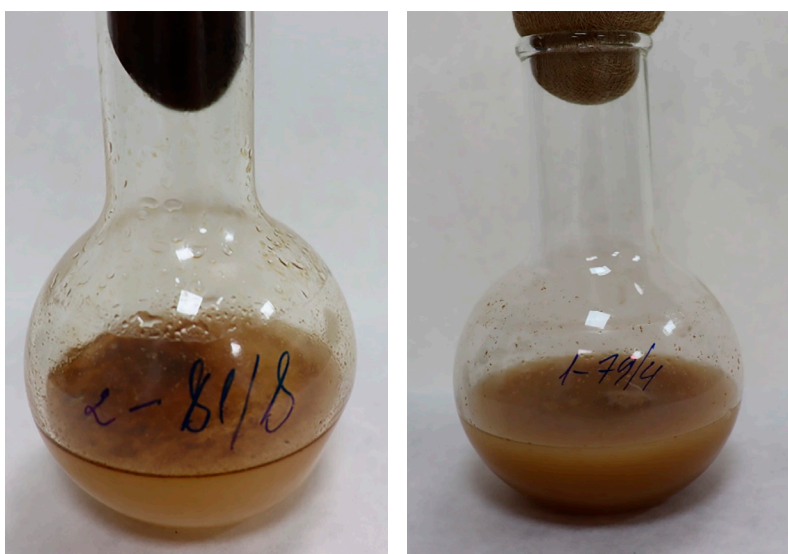


Рис. 4. Рост выделенных изолятов на минеральной среде с 1% нефтью месторождения Кумколь

Деструкция нефти м. Кумколь отобранными культурами
экстремофильных микроорганизмов

Изолят	Степень деструкции нефти, %	Изолят	Степень деструкции нефти, %
1-54/3	43,2	2-81/7	70,3
1-67/4	42,6	2-81/8	69,2
1-73/3	58,3	2-82/4	43,8
1-79/4	65,1	3-56/3	67,6
1-80/1	68,6	3-37/2	57,7
2-81/5	72,5	3-38/1	58,4
2-81/6	66,9	Контроль	12,1

Гравиметрический анализ показал, что наиболее активные изоляты деградировали 42,6–72,5% нефти (таблица). У остальных изолятов степень деструкции нефти составила менее 40%.

Все изоляты, показавшие высокую нефтеокисляющую активность, были устойчивы к высокой засоленности среды – свыше 100 г/л NaCl. Из них культуры 1-54/3, 1-73/3, 2-81/6 и 3-56/3 росли в среде с 20% NaCl, а культура 1-67/4 – с 25% NaCl. Также большинство отобранных изолятов показали хороший рост при pH 10, за исключением четырех культур, для которых оптимальной была нейтральная среда.

Заключение

Из экстремальных экосистем Казахстана было выделено 496 изолятов. Проведен скрининг по способности выделенных микроорганизмов расти в условиях высокой засоленности среды и при повышенных значениях pH. Установлено, что большинство изолятов были солетолерантными и росли на среде с 5% NaCl. С увеличением солёности до 10–25% количество изолятов, выдерживающих такие концентрации, значительно снизилось. Изучение влияния pH среды на рост выделенных культур показало, что практически все солетолерантные изоляты были адаптированы к щелочным условиям (pH 8). Более высокие значения pH выдерживало меньшее количество культур. 52% солетолерантных культур показали способность к росту при 40°C. При повышении температуры до 50°C рост наблюдался только у 30 изолятов, а до 60°C – у 5 изолятов.

Изучена способность выделенных культур расти на нефти как единственном источнике углерода и энергии. В результате было отобрано 13 культур, при культивировании которых деструкция нефти составила 42,6–72,5%. Все эти культуры были солеустойчивы, а также росли в условиях повышенных pH. Таким образом, были отобраны микроорганизмы, перспективные для био-

ремедиации нефтезагрязненных экосистем в экстремальных условиях.

Список литературы

1. Чернявская М.И. Сравнительная характеристика углеводородокисляющих бактерий различных климатических зон: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Минск, 2016. 26 с.
2. Sun-Wook J., Yong J.C. Extremophilic Microorganisms for the Treatment of Toxic Pollutants in the Environment // *Molecules*. 2020. Vol. 25. P. 4916-4932. DOI: 10.3390/molecules25214916.
3. Kour D., Khan S.S., Kour H., Kaur T., Devi R., Rai P.K., Judy C., McQuestion C., Bianchi A., Spells S., Mohan R., Rai A.K., Yadav A.N. Microbe-mediated bioremediation: Current research and future challenges // *J. Of Appl. Biology & Biotechnology*. 2022. Vol. 10 (Suppl 2). P. 6-24. DOI: 10.7324/JABB.2022.10s202.
4. Le Borgne S., Paniagua D., Vazquez-Duhalt R. Biodegradation of Organic Pollutants by Halophilic Bacteria and Archaea // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2008. Vol. 15. P. 74–92. DOI: 10.1159/00012132.
5. Pernetti M., Di Palma L. Experimental evaluation of inhibition effects of saline wastewater on activated sludge // *Environ. Technol.* 2005. Vol. 26. P. 695–703. DOI: 10.1080/09593330.2001.9619509.
6. Al-Mailem D.M., Eliyas M., Khanafer M., Radwan S.S., Culture-dependent and culture-independent analysis of hydrocarbonoclastic microorganisms indigenous to hypersaline environments in Kuwait // *Microb. Ecol.* 2014. Vol. 67. P. 857-865. DOI: 10.1007/s00248-014-0386-5.
7. Khemili-Talbi S., Kebbouche-Gana S., AkmoussiToumi S., Angar Y., Gana M.L., Isolation of an extremely halophilic archaeon *Natrialba* sp. C21 able to degrade aromatic compounds and to produce stable biosurfactant at high salinity // *Extremophiles*. 2015. Vol. 19. No. 6. P. 1109-1120. DOI: 10.1007/s00792-015-0783-9.
8. Al-Hawash A.B., Dragh M.A., Li S., Alhujaily A., Abbood H.A., Zhang X., Fuying M. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment // *The Egyptian Journal of Aquatic Research*. 2018. Vol. 44. No. 2. P. 71-76. DOI: 10.1016/j.ejar.2018.06.001.
9. Shukla A.K., Singh A.K. Exploitation of Potential Extremophiles for Bioremediation of Xenobiotics Compounds: A Biotechnological Approach // *Current Genomics*. 2020. Vol. 21. P. 161-167. DOI: 10.2174/1389202921999200422122253.
10. ГОСТ 17.4.4.02-2017. Охрана Природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. М.: Стандартинформ, 2018. 18 с.
11. Гланц С. Медико-биологическая статистика / пер. с англ. М.: Практика, 1998. 459 с.
12. Vincent S.G.T., Jennerjahn T., Ramasamy K., Chapter 3 - Environmental variables and factors regulating microbial structure and functions. Microbial Communities in Coastal Sediments // Elsevier, 2021. P. 79-117. DOI: 10.1016/B978-0-12-815165-5.00003-0.