

М. И. ЧЕРНЯВСКАЯ, М. В. КОЗЛОВА, М. А. ТИТОК

МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЬЮ И НЕФТЕПРОДУКТАМИ ПОЧВ

Исследован деградативный потенциал и ферментативная активность 44 штаммов бактерий, изолированных из трех образцов загрязненной нефтепродуктами почвы (L5A, L10, L15). Наибольшим видовым разнообразием характеризовался образец L5A, из которого выделено 20 штаммов микроорганизмов, отличающихся по морфологическим признакам. Установлено, что 75 % штаммов из образца L5A, 79 % из образца L10 и 40 % из образца L15 участвовали в утилизации нефти, нефтепродуктов (керосин, дизельное топливо) и отдельных углеводородов (гексан, нонан, гептаметилнонан, гексадекан, толуол, *o*-ксилол, этилбензол, фенол, нафталин, антрацен, фенантрен, бифенил, пирен). Анализ ферментативной активности показал, что все штаммы, выделенные из образцов L10 и L15, и половина штаммов из образца L5A обеспечивали круговорот азота. Во всех почвенных образцах присутствовали бактерии, участвовавшие в круговороте серы, а также обладавшие протеолитической, целлюлолитической, амилитической и сахаролитической активностями. Выявлено 4 штамма-деструктора, имеющих широкий спектр утилизируемых углеводородов, пригодных для биоремедиации почв, загрязненных нефтью и продуктами ее переработки.

Ключевые слова: бактерии-деструкторы нефти; углеводороды нефти; консорциум; ферментативная активность.

In this research degrading potential and enzymatic activity of 44 bacterial strains were investigated. These strains were isolated from three oil-contaminated soil samples (L5A, L10, L15). The sample L5A was characterized by the highest species diversity. Twenty strains of microorganisms, which had different morphological features, were isolated from this sample. It was established that 75 % of strains from the sample L5A, 79 % from the sample L10, and 40 % from the sample L15 were able to degrade oil, petroleum, fuel oil, and hydrocarbons (hexane, nonane, heptamethylnonane, hexadecane, toluene, *o*-xylene, ethylbenzene, phenol, naphthalene, anthracene, biphenyl, pirene). It was shown that all strains from samples L10 and L15, and 10 strains from the sample L5A took part in the nitrogen cycle. The strains involved in cycling of sulfur, and ones with proteolytic, cellulolytic, amilolytic, and sacchrolytic activities were found in all samples. Four hydrocarbon degrading strains with the wide degrading capacity were identified. These strains are suitable for oil-contaminated soil bioremediation.

Key words: oil degrading bacteria; oil hydrocarbons; consortium; enzymatic activity.

Загрязнение природной среды нефтью и нефтепродуктами – актуальная экологическая проблема. Попадание нефти в почву приводит к изменению ее морфологических, физических, физико-химических свойств и негативно влияет на жизнедеятельность всех живых организмов [1, 2]. Известно, что одним из экологически безопасных средств борьбы с загрязнениями природного и антропогенного происхождения является использование бактерий-деструкторов, способных утилизировать опасные углеводороды нефти. Ни один отдельно взятый микроорганизм не способен утилизировать все компоненты нефти (в ее состав входит более 1000 химических соединений), поэтому для создания биопрепаратов используются консорциумы бактерий-деструкторов, взаимодополняющих действие друг друга [3].

Современные биотехнологии применяют методологические подходы, основанные на процессах, происходящих в естественной среде обитания. В частности, широко распространенный в природе горизонтальный перенос генов между организмами различных таксономических групп используют при создании генетически модифицированных организмов. К сожалению, наши познания систем, обеспечивающих биологическое разнообразие организмов в стрессовых условиях среды, весьма ограничены. В этом плане перспективными представляются исследования по определению метаболического потенциала природных микробных сообществ, способных эффективно размножаться в условиях длительных антропогенных нагрузок. Управление процессами биodeградации должно быть направлено на активизацию природных микробных сообществ и создание оптимальных условий для их существования.

Цель настоящей работы – изучение спектра утилизируемых субстратов у культивируемых аэробных и факультативно анаэробных бактерий, выделенных из песчаной почвы, подвергавшейся загрязнению нефтью и нефтепродуктами.

Материалы и методика исследований

В работе были изучены три образца песчаной почвы L5A (территория бензоколонки № 1, Эль-Азизия), L10 (территория бензоколонки № 1, Готэль-Шааль), L15 (территория бензоколонки № 615, Эз-Завия), загрязненные нефтью и нефтепродуктами, отобранные на территории Ливии.

Штаммы почвенных микроорганизмов отбирали на полноценной агаризованной среде с учетом морфологических различий.

Способность штаммов расти с использованием нефти исследовали в жидкой минеральной среде M9, способность расти с использованием нефтепродуктов или отдельных углеводородов в качестве единственного источника углерода изучали на агаризованной минеральной среде M9 [4].

Ферментативную активность (ферменты классов оксидоредуктаз и гидролаз) определяли стандартными методами [5, с. 14–18; 20–21].

Результаты исследований и их обсуждение

Из трех песчаных почвенных образцов с характерным сильным запахом нефтепродуктов (L5A, L10, L15) на основании морфологических отличий было изолировано 44 штамма микроорганизмов. Следует отметить, что выделенные бактерии представляли собой лишь часть природных консорциумов, поскольку не включали облигатно-анаэробные и некультивируемые микроорганизмы, являющиеся неотъемлемой частью почвенных микроекосмов. Наличие большого разнообразия штаммов в почвах, подвергавшихся постоянному воздействию поллютантов (почвы изолировали на территории бензоколонок в Ливии), может свидетельствовать о высоком адаптивном потенциале сформировавшихся природных сообществ. Способность изолированных бактерий существовать в постоянных стрессовых условиях внешней среды должна обеспечиваться присутствием деструкторов, а также гетеротрофных бактерий, утилизирующих продукты метаболизма, образующиеся в результате деградации углеводородов нефти и других органических соединений, попадающих в почву извне.

Для изучения биодegradативного потенциала выделенных микроорганизмов определяли их способность использовать в качестве единственного источника углерода и энергии нефть, нефтепродукты (керосин, дизельное топливо) или отдельные их составляющие, в частности алифатические (гексан, нонан, гексадекан, гептамилнонан), моно- (толуол, *o*-, *m*-, *n*-ксилол, этилбензол, фенол) и полиароматические (нафталин, антрацен, фенантрен, пирен, бифенил, флюорен) углеводороды, концентрация которых в почве возрастает со временем (за счет испарения летучих компонентов нефти) и представляет опасность для живых организмов. Было установлено, что наибольшее количество бактерий-деструкторов присутствовало в образцах L5A и L10, в которых из 20 и 14 изолированных штаммов 15 (75 %) и 11 (79 %), соответственно, обуславливали деградацию нефти, нефтепродуктов или отдельных их компонентов (табл. 1). Причем в каждом образце присутствовали штаммы, обладающие широким спектром утилизируемых субстратов. Штамм Ар из образца L5A утилизировал 16 из 19 изученных субстратов. Штаммы 8 и 12 из образца L10 были способны расти с использованием 10 и 9 субстратов соответственно. Штаммы 4А и 3А из образца L15 росли на средах с 14 и 10 субстратами соответственно.

Первичная характеристика изолированных микроорганизмов позволила установить, что из почвенных образцов L5A и L10 было выделено примерно равное количество грамположительных и грамотрицательных бактерий, тогда как в изоляте L15 преобладали грамотрицательные микроорганизмы (70 % штаммов) (см. табл. 1).

Таблица 1

Деградaтивная активность изолированных микроорганизмов

Утилизируемый субстрат	Штаммы-деструкторы, выделенные из почвенных образцов					
	L5A (20 штаммов)	Всего, %	L10 (14 штаммов)	Всего, %	L15 (10 штаммов)	Всего, %
Нефть	2, 15, 16, Ар, Аб, 3, 4, 5, 10, 11	50	3-1, 3-2, 8, 15, 1N, 1, 2, 3-3	57	4A, 1, 3, 3A	40
Керосин	2, 16, Ар, Аб, 14	25	3-1, 8, 12, 15	29	4A	10
Дизельное топливо	2, 8, 9, 16, Ар, Аб, 14	35	3-1, 8, 12, 15	29	4A	10
Гексан	–	0	8, 12	14	4A, 3A	20
Нонан	Ар, Аб	10	8, 12	14	4A, 3A	20
Гептамилнонан	Ар, 9, 14, Aш	20	8, 12	14	3A	10
Гексадекан	15, Аб, Ар	15	3-1, 15	14	4A, 3A	20
Толуол	Ар	5	15	7	–	0
<i>o</i> -Ксилол	Ар	5	–	0	–	0
<i>m</i> -Ксилол	–	0	–	0	–	0
<i>n</i> -Ксилол	–	0	–	0	–	0
Этилбензол	7, 8, 9, Ар	20	8, 12	14	4A	10
Фенол	2, 8, 9, 16, Ар, Аб	30	8, 12, 15	21	4A, 3A	20
Нафталин	Ар	5	6, 3, 1N	21	4A	10
Антрацен	16, Ар	10	6	7	4A, 3A	20
Фенантрен	16, Аб, Ар	15	6, 2	14	4A, 3A	20
Пирен	Ар	5	6	7	4A, 3A	20
Бифенил	16, Ар	10	8, 12	14	4A, 3A	20
Флюорен	9, Ар	10	8, 12	14	4A	10

Утилизируемый субстрат	Штаммы-деструкторы, выделенные из почвенных образцов					
	L5A (20 штаммов)	Всего, %	L10 (14 штаммов)	Всего, %	L15 (10 штаммов)	Всего, %
Штаммы, изолированные из почвы	2, 7, 8, 9, 15, 16, Ар, Аб, Аж, 1, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, Аш		5, 6, 8, 3-1, 3-2, 12, 15, 7, 1N, 3-3	1, 2, 3, 4	1А, 4А, 1, 2, 3, 3А, 4, 5, 8, 10	
Всего штаммов-деструкторов, %	75		79		40	

Примечание. Жирным шрифтом выделены штаммы с граммотрицательным типом клеточной стенки.

Среди 22 штаммов, утилизирующих нефть, 12 имели граммотрицательную клеточную стенку. Все штаммы, выделенные из почвенного образца L5A, и 40–50 % штаммов соответственно из почвы L15 и L10 росли при температуре 42 °С. Следует отметить, что почва L5A изолирована на территории бензоколонки в Эль-Азизии. Именно этот район Ливии характеризуется самым жарким климатом и здесь зафиксирована рекордно высокая температура +58 °С. Почвенные образцы L10 и L15 были взяты в районах, расположенных ближе к Средиземному морю, где температура воздуха не превышает +37 °С.

Известно, что нефть и нефтепродукты в больших концентрациях губительно влияют на животные и растительные организмы, а также ингибируют жизнедеятельность большинства микроорганизмов за счет подавления их ферментативной активности. Наличие большого фенотипического разнообразия изолированных бактерий свидетельствует о наличии у них систем метаболизма (либо защитных механизмов), позволяющих им существовать в почве, загрязненной смесью углеводов и других органических соединений. Способностью размножаться в подобных стрессовых условиях могут обладать только те микроорганизмы, которые оказывают положительное влияние друг на друга и на среду своего обитания, обеспечивая протекание широкого спектра биохимических реакций. Например, за счет наличия оксидоредуктаз (каталаза, оксидаза, нитрат- и нитритредуктаза и др.) и гидролаз (протеаза, лецитиназа, амилаза, целлюлаза, уреазы, сахаролитические ферменты и др.) в микробной клетке протекают окислительно-восстановительные реакции и расщепляется широкий спектр органических субстратов.

Анализ ферментативной активности позволил установить, что в исследованных бактериальных сообществах из образцов L5A и L10 все выделенные микроорганизмы обладают каталазной активностью и, следовательно, способны противостоять окислительному стрессу, снижая летальное действие перекиси водорода на клетку. В бактериальном сообществе из почвы L15 80 % штаммов обладали каталазной активностью. Возможно, присутствие в популяции каталазоотрицательных бактерий дополнительно обеспечивало перекисное окисление органических веществ, в результате которого образовывались молекулы воды (данный тип реакций окисления достаточно широко распространен и обеспечивается пероксидазами).

Оксидаза (определяли активность цитохром *c*-оксидазы) является трансмембранным ферментом, функция которого заключается в передаче электронов на молекулы кислорода, в результате чего образуются молекулы воды, а также в обеспечении трансмембранного потенциала, необходимого для синтеза АТФ. Наличие данного фермента может свидетельствовать о том, что конечным акцептором электронов в окислительно-восстановительных реакциях, происходящих в клетке, является кислород. Анализ на присутствие оксидазной активности показал, что половина штаммов (40–50 %) в каждом образце являются оксидазоположительными. Причем отсутствие оксидазы фиксировали и для деструкторов нефти (в частности, штамм 16 из образца L5A и штамм 15 из образца L10 являлись оксидазоотрицательными) (табл. 2). Следовательно, в изученных почвах окисление углеводов нефти потенциально может происходить в аэробных и анаэробных условиях [6].

Таблица 2

Ферментативная активность изолированных микроорганизмов

Фермент	Наличие ферментативной активности у штаммов, выделенных из почвенных образцов					
	L5A (20 штаммов)	Всего, %	L10 (14 штаммов)	Всего, %	L15 (10 штаммов)	Всего, %
Каталаза	2, 7, 8, 9, 15, 16, Ар, Аб, Аж*, 1*, 3, 4, 5, 6*, 10, 11, 12*, 13*, 14, Аш	100	5*, 6, 8, 3-1, 3-2, 12, 15, 1, 2, 3*, 4*, 7*, 1N, 3-3	100	1, 1А*, 4А, 3, 3А, 4*, 5*, 10*	80
Оксидаза	3, 5, 6*, 11, 12*, 13*, 14, Аш	40	2, 3*, 4*, 1N, 3-2, 3-3	43	2*, 3, 3А, 4*, 8*	50

Фермент	Наличие ферментативной активности у штаммов, выделенных из почвенных образцов					
	L5A (20 штаммов)	Всего, %	L10 (14 штаммов)	Всего, %	L15 (10 штаммов)	Всего, %
Нитратредуктаза	2, 7, 8, 9, 15, 16, Аб, Аж*, 6*, Аш	50	5*, 6, 8, 3-1, 3-2, 12, 15, 1, 2, 3*, 4*, 7*, 1N, 3-3	100	1А*, 4А, 3, 3А, 4*, 5*, 8*, 10*	80
Нитритредуктаза	2, 7, Аб, Аж*, 16, 6*	30	2, 3-2, 1N	21	1, 2*, 5*	30
Уреаза	2, 16, Аб, 1*	20	3-1, 15	14	1А*	10
Образование сероводорода	8, 9, Ар, 1*, 4, 5, 10, Аш	40	6, 8, 3-2, 12, 4*, 7*, 3-3	50	1, 3, 4*, 8*	40
Протеазы	9, 6*	10	7*, 8	14	1А*, 3, 10*	30
β-Амилаза	7, 8, 9, 6*, 11, 12*, 13*, 14	40	6, 3-1, 3-2, 15, 2, 3*, 7*, 3-3, 1N	64	1, 1А*, 2*, 3А, 5*	50
Целлюлаза	7, 8, 9	15	5*, 8	14	8*, 3А	20
Субстрат	Наличие сахаролитических ферментов у штаммов, выделенных из почвенных образцов					
	L5A (20 штаммов)	Всего, %	L10 (14 штаммов)	Всего, %	L15 (10 штаммов)	Всего, %
Глюкоза	9, Аж*, 1*, 4	20	8	7	1, 1А*, 4А, 3, 3А, 5*	60
Лактоза	16, Аж*, 1*, 4, 10	25	8	7	–	0
Сахароза	Аж*, 10	10	8	7	–	0
Манноза	Аж*, 1*, 4, 10	20	5*, 8, 12, 1, 2, 3*, 3-3, 1N	57	3	10
Маннит	Аж*, 1*, 4, 10	20	–	0	3	10

Примечания: 1. Штаммы, не являющиеся деструкторами углеводов, обозначены значком «*». 2. Жирным шрифтом выделены грамотрицательные бактерии.

Присутствие нефти в почве в больших концентрациях приводит к увеличению содержания углерода, и, соответственно, нарушается соотношение С : N [7, 8]. При этом у природных бактерий подавляется активность ферментов, участвующих в обмене углерода, азота и серы [9]. Особенно чувствительны к воздействию нефти нитрифицирующие и целлюлозолитические бактерии.

В круговороте азота основная роль принадлежит азотфиксирующим бактериям, а также микроорганизмам, содержащим, в частности, нитрат-, нитритредуктазы и уреазы. Поскольку выделение азотфиксаторов требует использования определенных селективных условий, они не попали в поле зрения настоящего исследования. Анализ нитрат-, нитритредуктазной и уреазной активностей позволил установить, что во всех исследованных бактериальных сообществах присутствуют микроорганизмы, обладающие данными типами ферментативных активностей. В частности, все штаммы бактерий из образца L10 содержали нитратредуктазы. Способностью к продуцированию нитритредуктазы обладали 30 % штаммов из образцов L5A и L15 и 21 % – из образца L10. Наличие уреазной активности выявлено в клетках у 10–20 % исследованных штаммов. При этом ряд бактерий обладал двумя или тремя активностями одновременно. Например, штамм 16 бактерий – деструкторов нефти из образца L5A характеризовался всеми типами исследованных активностей (см. табл. 2).

В круговорот серы (за счет образования сероводорода) вовлечено не менее 40–50 % штаммов, в том числе и бактерии – деструкторы нефти и углеводов.

Почва является открытой системой, в которую попадают остатки живых организмов, а вместе с ними химические соединения, представленные белками и углеводами. Для их расщепления, в частности, необходимы протеазы, амилазы, целлюлазы и сахаролитические ферменты. Наличие бактерий, обладающих вышеуказанными типами ферментативных активностей, опосредованно указывает либо на присутствие определенных химических веществ в почве, либо на преадапционный потенциал микробной популяции, способной трансформировать определенный тип соединений в случае их поступления в среду обитания.

Наличие протеолитических ферментов у выделенных бактерий определяли по способности гидролизовать казеин и желатину [9]. Бактерии, продуцирующие протеазы, были выявлены в каждом

образце. Протеолитическая активность была отмечена для 7 штаммов, в том числе для двух деструкторов нефти из образцов L10 и L15.

Наиболее чувствительными к нефтяному загрязнению являются аэробные целлюлозоразрушающие микроорганизмы. Целлюлоза – один из самых распространенных в природе растительных полимеров, попадающий в почву с отмершими остатками растений [2]. В каждой из исследованных популяций присутствовали штаммы, обладающие способностью утилизировать целлюлозу (см. табл. 2). Среди бактерий – деструкторов нефти только два штамма (8 из образца L10 и 3А из образца L15) проявляли целлюлозолитическую активность.

Широко распространен в природе и такой полимер, как крахмал [10]. В почвенном образце L10 более половины выделенных штаммов обеспечивали расщепление крахмала, причем данной способностью обладали практически все деструкторы нефти и отдельных углеводов. Пять видов бактерий из образца L15 характеризовались наличием амилаз, в том числе два деструктора нефти. В образце L5А амилитическую активность проявляли 40 % штаммов, в том числе штамм – деструктор нефти 11.

Некоторые из выделенных бактерий были способны сбраживать сахара с образованием кислоты (продуцировать сахаролитические ферменты). В частности, в образце L5А присутствовали бактерии, утилизирующие все исследованные углеводы (штаммы Аж, 1, 4). В образце L10 не обнаружено бактерий, использующих маннит, а в образце L15А – лактозу и сахарозу.

На основании полученных данных можно предположить, что наиболее адаптированным сообществом микроорганизмов, способным противостоять постоянному воздействию ксенобиотиков, является консорциум L5А. Исследованная природная популяция характеризовалась самым широким видовым разнообразием культивируемых организмов (20 морфотипов), представленных грамположительными (9 штаммов) и грамотрицательными (11 штаммов) бактериями, большинство из которых (15 штаммов) обуславливали деградацию нефти и составляющих ее углеводов. Именно в этом консорциуме присутствовал штамм Ар, утилизовавший практически все исследуемые субстраты (16 из 19 использованных ксенобиотиков). Штаммы, не обладавшие деградативными свойствами (всего 5 штаммов), вносили существенный вклад в круговорот углерода, азота и серы, участвовали в метаболизме углеводов и белков. При этом большинство из них характеризовались широким спектром ферментативных активностей (штаммы 1, 6 и Аж).

В целом отличительной особенностью исследованных сообществ было присутствие бактерий, утилизовавших широкий спектр ксенобиотиков и обеспечивающих круговорот веществ в почве.

Штаммы – деструкторы нефти, обладающие наиболее широким спектром деградативной активности (Ар – из образца L5А; 8 – из образца L10; 3А и 4А – из образца L15), могут быть использованы для биоремедиации загрязненных почв.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Шамраев А. В., Шорина Т. С. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды // Вестн. ОГУ. 2009. № 6 (100). С. 642–645.
2. Киреева Н. А., Водопьянов В. В., Мифтахова А. М. Влияние нефтяного загрязнения на целлюлазную активность почв // Почвоведение. 2000. № 6. С. 748–753.
3. Морозов Н. В., Хуснетдинова Л. З., Жукова О. В. Использование иммобилизованных на органическом сорбенте нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // Фундаментальные исследования (Технические науки). 2011. № 12. С. 576–579.
4. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976. С. 393.
5. Желдакова Р. А. Выделение и идентификация микроорганизмов : учеб.-метод. пособие. Минск, 2003.
6. Жуков Д. В., Мурыгина В. П., Калюжный С. В. Механизмы деградации углеводов нефти микроорганизмами // Успехи современной биологии. 2006. Т. 126, № 3. С. 285–296.
7. Рахимова Э. Р., Гарусов А. В., Зарипова С. К. Биологическая активность нефтезагрязненной почвы при заселении // Почвоведение. 2005. № 4. С. 481–485.
8. Marin J. A., Hernandez T., Garcia C. Bioremediation of oil refinery sludge by land farming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity // Environmental Research. 2005. № 98. P. 185–195.
9. Звягинцев Д. Г., Асеева И. В., Бабьева И. П., Мирчинк Т. Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М., 1980. С. 224.
10. Киреева Н. А., Новоселова Е. И., Хазиев Ф. Х. Активность карбогидраз в нефтезагрязненных почвах // Почвоведение. 1998. № 12. С. 1444–1448.

Поступила в редакцию 03.06.2014.

Мария Ивановна Чернявская – младший научный сотрудник НИЛ биотехнологии кафедры микробиологии.

Мария Викторовна Козлова – студентка 5-го курса биологического факультета.

Марина Алексеевна Титок – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии.