

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ШТАММОВ РОДА *ACINETOBACTER* ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ НА ТЕРРИТОРИИ ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ

О. О. Логинова, Т. Т. Данг, Е. В. Белоусова, М. Ю. Грабович

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 21.04.2011 г.

Аннотация. Исследована возможность использования штаммов *Acinetobacter* sp.: 134 (B-3780), ACKS1 (B-2838) и ВСБ-567 (B-5064) для биоремедиации нефтезагрязненных почв на территории Воронежской области. Показано, что степень деградации нефтепродуктов отработанного машинного масла штаммами *Acinetobacter* в микрополевым опыте в течение 60 дней в системе «почва + масло» составила 8,83 %, в системе «почва + масло + опилки» 14,35 %, а в системах «почва + масло + бактерии» и «почва + масло + опилки + бактерии» 48,37 % и 20,98 % соответственно. Исследование динамики ферментативной активности почв в ходе биоремедиации показало, что в системе «почва + масло» наблюдалось резкое снижение коэффициента гумификации в связи с загрязнением почвы, тогда как в системе «почва + масло + бактерии» замедлялось падение коэффициента гумификации в 2,5 раза после внесения культуры углеводородразлагающих бактерий. Полученные результаты свидетельствуют о положительной направленности гумусообразования, способствующего повышению плодородия почвы. Выявлена способность данных штаммов к образованию биосурфактантов.

Ключевые слова: биодegradация, *Acinetobacter*, нефтедеструкторы, нефтепродукты.

Abstract. The possibility of application of *Acinetobacter* strains 134 (B-3780), ACKS1 (B-2838), ВСБ-567 (B-5064) for remediation of oil-contaminated soils in the Voronezh region was studied. The level of degradation of waste oil in microfield experience within 60 days in the systems “soil + waste oil” and “soil + waste oil + sawdust” was 8,83 % and 14,35%; and in the systems “soil + waste oil + bacteria” and “soil + waste oil + sawdust + bacteria” it was 48,37% and 20,98%, respectively. The investigation of enzymatic activity of the soil within remediation showed sharp decrease of humification coefficient in the system “soil + waste oil”, as a consequence of soil pollution, whereas fall of humification coefficient in the system “soil + waste oil + bacteria” was slowed by 2.5 times, as a consequence of inoculation of hydrocarbon oxidizing strains. The results indicate a positive direction of humification that increases soil fertility. The ability to the biosurfactant formation was by these strains was endorsed.

Keywords: biodegradation, *Acinetobacter*, the oil degradation, petroleum products.

ВВЕДЕНИЕ

Нефть является распространенным техногенным загрязнителем, при разливах которой на длительное время нарушается нормальное функционирование почвенной экосистемы, ухудшается почвенное плодородие и резко меняется интенсивность и направленность окислительно-восстановительных процессов. Поступление нефти в почву неоднозначно влияет на активность ферментов, которая может как усиливаться, так и ослабевать в зависимости от дозы и вида загрязнителя и типа почвы, подвергшейся загрязнению. Одной из наиболее щадящих для окружающей среды технологий ликвидации последствий нефтяного загрязнения является биоремедиация.

Углеводороды в виде высокомолекулярных парафинов, ароматических и полициклических соединений, связываясь с частицами почвы, становятся ограниченно доступными для микроорганизмов, использование сурфактантов может увеличить десорбцию и растворимость углеводородов нефти и тем самым повысить биодоступность гидрофобных соединений для микробных клеток [4]. Однако, применение синтетических ПАВ приводит к накоплению в почве веществ, не свойственных для окружающей среды. Более экологически безопасно и экономически выгодно использование биосурфактантов, они менее токсичны, лучше деградируются, обладают высоким пенообразованием, селективностью и специфической активностью, устойчивостью к повышенным температурам, рН и солям, а их производство экономично, так как основано на использовании дешевых суб-

© Логинова О. О., Данг Т. Т., Белоусова Е. В., Грабович М. Ю., 2011

стратов [7]. Образующий культурой *Acinetobacter* sp. гетерополисахарид эмульсан в концентрации 0,1 г/л способен отмыть до 89% сырой нефти от нефтесодержащего песка [3]. Важным направлением использования микроорганизмов, образующих биосурфактанты, является разработка технологий биоремедиации почв, загрязненных углеводородами.

Проблемы нефтезагрязнения характерны не только для районов добычи и переработки нефти. Потенциально, любой город или район может столкнуться с данной проблемой, поскольку хранилища горюче-смазочных материалов распространены повсеместно. Известно, что при легком механическом составе, например, супесчаных и суглинистых почв легкие фракции нефти и нефтепродуктов могут проникать на глубину 1,5—2,0 м, уничтожая все живое и подавляя биологическую активность почв, физические методы очистки при таких масштабах загрязнения нефтью совершенно не эффективны [6]. Поэтому целью нашей работы была разработка эффективных способов биоремедиации нефтезагрязненных почв в условиях местного региона.

Для выполнения цели нами были поставлены следующие задачи:

- постановка микрополевого опыта по изучению деструкции нефтепродуктов в почве исследуемыми штаммами *Acinetobacter* sp.;
- изучение влияния биоремедиации на ферментативную активность почвы и процессы гумификации.
- выделение биосурфактантов из бактериальной культуры *Acinetobacter* p. и определение их свойств.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для изучения биодеградации нефти использовались следующие штаммы *Acinetobacter*: *Acinetobacter* sp. 134 (В-3780), АСКS1 (В-2838) и ВСБ-567 (В-5064), полученный из Всероссийской коллекции Промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИГенетика.

СОСТАВ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Для культивирования штаммов *Acinetobacter* использовали питательную среду L следующего состава (г/л): дрожжевой экстракт 5,0; пептон 15,0; NaCl 5,0; дистиллированная вода 1 л.

Опыты по изучению окисления углеводородов нефти проводили с использованием минеральной среды следующего состава(г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 1;

Na_2HPO_4 — 0,2; KH_2PO_4 — 0,3; K_2HPO_4 — 0,7; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2; CaCl_2 — 0,01; Дистиллированная вода — 1 л [1].

В минеральные среды перед посевом вносили набор витаминов и микроэлементов [5], рН среды перед посевом доводили до 7.2—7.5.

МЕТОДИКА УЧЕТА ЧИСЛЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Для учета численности микроорганизмов в почве, из каждого участка отбирали пробы массой 1 г. Навеску пробы почвы переносили в колбу, содержащую 100 мл стерильной водопроводной воды, и взбалтывали на качалке 10 мин, затем проводили серию 10 кратных разведений. Из полученных разведений делали высеив на агаризованные среды по стандартной методике. Инкубировали при 27 °С в термостате. После этого производили подсчет выросших колоний.

ПОСТАНОВКА МИКРОПОВОЛЕВОГО ОПЫТА

Для изучения возможности биоремедиации почв загрязненных нефтепродуктами с помощью штаммов *Acinetobacter* был заложен микрополевым опытом. В микрополевым масштабе ремедиация осуществлялась на специально оборудованной площадке в естественных условиях. Эксперимент проводили при 13—30 °С, регулярной агротехнической обработке: рыхление один раз в неделю и увлажнение почвы.

Схема микрополевого опыта:

1. Незагрязненная почва (контроль) — «почва без воздействия»;
2. Загрязненная отработанным маслом почва (без бактерий) — система «масло»;
3. Загрязненная отработанным маслом почва + бактерии — система «масло + бактерии»;
4. Загрязненная отработанным маслом почва + опилки + мочевины — система «масло + опилки»;
5. Загрязненная отработанным маслом почва + опилки + мочевины + бактерии — система «масло + опилки + бактерии»;

В данном опыте почву однократно загрязняли отработанным машинным маслом в дозе 10 г/кг почвы в слое 0—20 см. Общая площадь делянки (1×4) м, учетная— (1×0,8) м. Бактериальную культуру вносили дважды в начале эксперимента и спустя четыре недели.

Раз в неделю производился отбор образцов и выполнялись в двукратной повторности следующие виды анализов: содержание нефтепродуктов методом ИК-спектрометрии; количественный учет клеток; анализ ферментативной активности почвы.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ НЕФТЕПРОДУКТОВ В ПОЧВЕ ИК-ФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Нефтепродукты из почвы экстрагировали четыреххлористым углеродом, хроматографически отделяли сопутствующие органические соединения других классов, и количественно определяли нефтепродукты по интенсивности поглощения в ИК-области спектра на концентратометре КН-2м («Сибэкоприбор», г.Новосибирск) согласно инструкциям производителя [8].

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВ

Определение каталазы проводили по методу Джонсона и Темпле (1964) титрованием 0,1 н раствором KMnO_4 , активность выражали в мл 0,1н KMnO_4 / г сух. почвы за 20 минут [9].

Активность полифенолоксидазы определяли по образованию пурпурогаллина из пирогаллола. В качестве стандарта использовали раствор бихромата калия. 0,75 г $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ растворяли в 1 дм³ 0,5 М HCl (оптическая плотность этого раствора соответствует таковой раствора, содержащего 0,1 мг пурпурогаллина в 1мл). Для измерения активности полифенолоксидазы 5г образца почвы растворяли в 100 мл воды и добавляли 5 капель толуола, 20 минут вращали на шейкере, после чего фильтровали через синюю ленту. Для измерения к 10 мл фильтрата добавляли 5 мл 1% пирогаллола и инкубировали 24 ч. Измеряли на спектрофотометре при $\lambda=430$ нм и толщине кюветы 1 см. Для измерения активности пероксидазы помимо пирогаллола добавляли 1мл 0,5% H_2O_2 . Активность пероксидазы выражали в миллиграммах пурпурогаллина на 1 г почвы за 24 часа.

МЕТОДИКА ВЫДЕЛЕНИЯ БИОСУРФАКТАНТА

Для получения неочищенного биосурфактанта 5—7 суточную бактериальную культуру выращенную на минеральной среде с добавлением гексадекана в качестве источника углерода, отстаивали в течении часа в делительной воронке, после чего сливали нижний водный слой. Оставшуюся однородную гидрофобную окрашенную маслянистую массу подвергали ультразвуковому озвучиванию (30 мин, 23кГц, 0,7 А) с обязательным охлаждением. Экстракт, представляющий собой гликолипидный комплекс получали с использованием метилтретбутилового эфира (МТБЭ). МТБЭ добавляли к гидрофобному слою культуральной жидкости в соотношении 2:1. Экстракцию проводили на орбитальном шейкере (4ч, 120 об/мин); экстракт центрифугировали (10 мин, 3000 об/мин) после чего

органическую фракцию переносили в предварительно взвешенную круглодонную колбу. Растворитель удаляли при помощи роторного испарителя Laborota 4000 путем выпаривания на водяной бане с обратным холодильником при температуре 50°С, после чего колбу повторно взвешивали и рассчитывали количество неочищенного сурфактанта в пересчете на 1 л среды.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно анализу литературных источников, бактерии рода *Acinetobacter* являются эффективными деструкторами нефтепродуктов. В связи с этим наш выбор был остановлен на доступных, но малоизученных штаммах, имеющих в коллекции ВКПМ.

МИКРОПОЛЕВОЙ ЭКСПЕРИМЕНТ

При постановке эксперимента по деструкции нефтепродуктов в микрополевой системе использовали все три штамма (В-2838, В-3780, В-5064). В ходе культивирования в течение 60 дней деструкция нефтепродуктов в системе «почва + масло» составила 8,83%, в системе «почва + масло + опилки» 14,35%, а в системах «почва + масло + бактерии» и «почва + масло + опилки + бактерии» 48,37% и 20,98% соответственно (рис. 1, 2) Мы полагаем, что в условиях свежего загрязнения аборигенной микрофлоре необходимо время для адаптации к загрязнителю, поэтому внесение активных штаммов-деструкторов ускоряет процесс очистки в первый месяц.

Вероятно более низкая степень деградации нефти в системе «почва + масло + опилки + бактерии» связана с недостатком источника азота вследствие конкуренции за азот между целлюлозолитиками входящими в состав аборигенной микрофлоры и интродуцированными штаммами *Acinetobacter*.

Одновременно с измерением деструкции нефтепродуктов нами проводилось исследование динамики численности клеток. В контрольной системе «почва без воздействия» общая численность клеток оставалась относительно неизменной ($5 \cdot 10^6$ КОЕ/г почвы). В системах «масло» и «масло + опилки» наблюдалось увеличение численности клеток (до $6 \cdot 10^7$ — $7 \cdot 10^7$ КОЕ/г почвы), за счет активизации аборигенной микрофлоры в ответ на внесение в почву отработанного масла. В системах с добавлением культуры *Acinetobacter* наблюдался наибольший прирост численности клеток (до $9,8 \cdot 10^7$ — $1,4 \cdot 10^8$ КОЕ/г почвы) за счет активизации как аборигенной, так и интродуцированной микрофлоры (рис. 3). В ходе исследования во всех

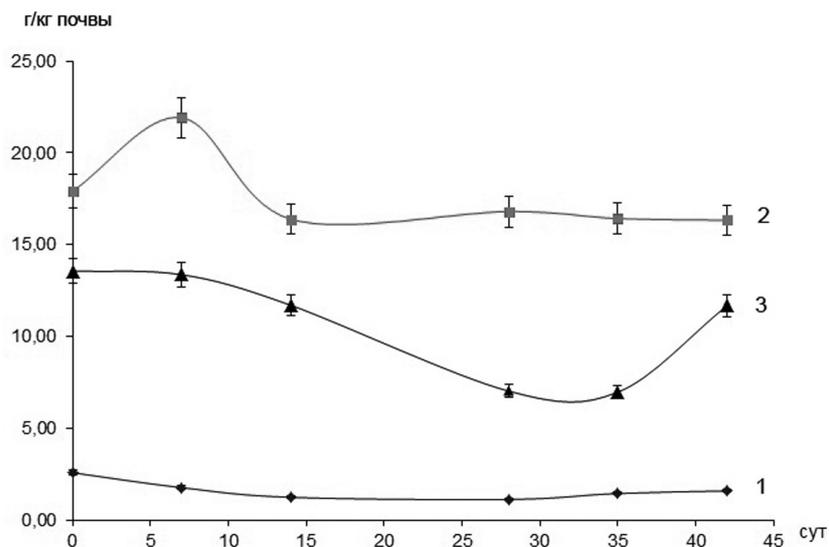


Рис. 1. Изменение содержания общих нефтепродуктов (г/кг почвы) в ходе микрополевого опыта (1 — почва без воздействия, 2 — система «масло», 3 — система «масло + бактерии»)

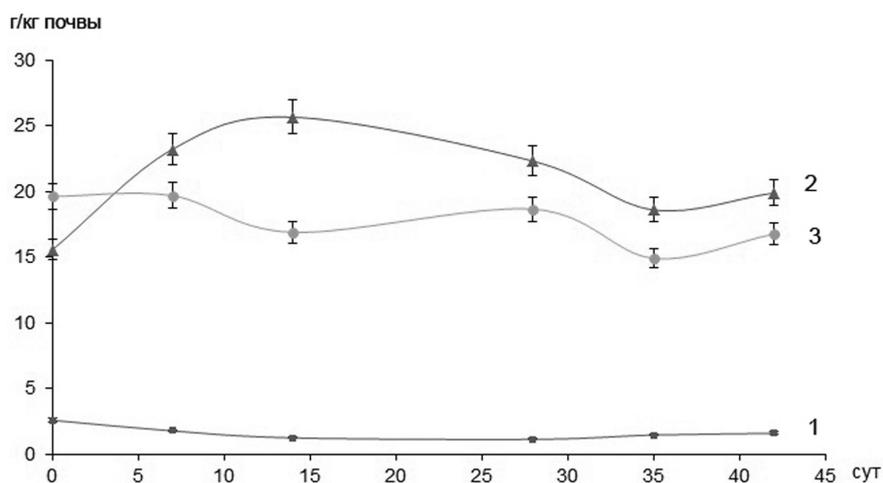


Рис. 2. Изменение содержания общих нефтепродуктов (г/кг почвы) в ходе микрополевого опыта (1 — почва без воздействия, 2 — система «масло + опилки», 3 — система «масло + опилки + бактерии»)

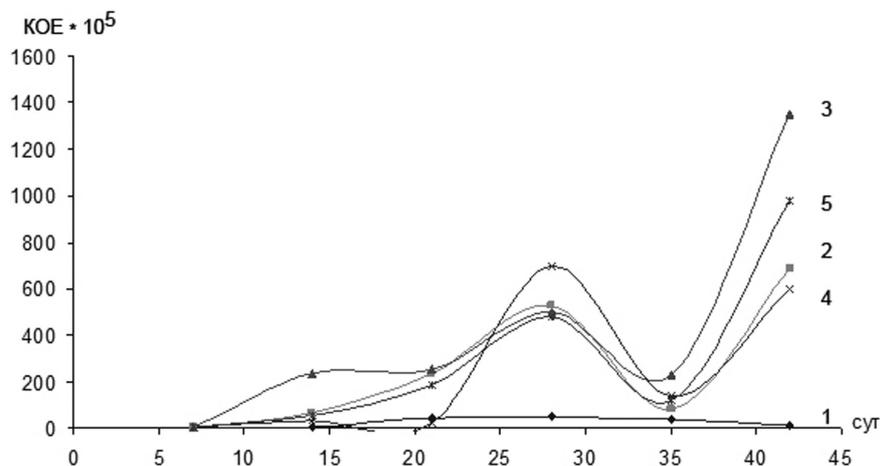


Рис. 3. Изменение численности клеток в процессе ремедиации (1 — почва без воздействия, 2 — система «масло», 3 — система «масло + бактерии», 4 — система «масло + опилки», 5 — система «масло + опилки + бактерии»)

Динамика пероксидазной и полифенолоксидазной активности в процессе ремедиации в микрополевоом эксперименте

Участки	Активность (мг пурпургаллина /г почвы за 24 часа)	Время (сут.)				
		7	14	21	35	42
почва	ПО	0,75	0,99	1,05	0,99	1,11
	ПФО	0,81	1,26	1,05	0,63	0,57
масло	ПО	0,27	0,63	1,2	1,26	0,9
	ПФО	0,51	1,11	1,08	0,63	0,69
масло + бактерии	ПО	0,3	1,11	1,05	1,2	1,2
	ПФО	0,39	1,08	1,05	0,75	0,63
масло + опилки	ПО	0,24	0,66	0,72	1,41	2,22
	ПФО	0,51	0,78	0,87	0,63	0,45
масло + опилки + бактерии	ПО	0,63	0,78	1,08	0,75	1,74
	ПФО	0,42	0,93	0,99	0,6	0,57

вариантах эксперимента отмечены флуктуации численности микроорганизмов. Вероятно, это связано с последовательным потреблением отдельных углеводов, что определяет сукцессию ассоциаций микроорганизмов.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧВЫ В ПРОЦЕССЕ БИОРЕМЕДИАЦИИ

Для определения изменения биологической активности почвы в процессе биоремедиации часто используют показатели пероксидазной и полифенолоксидазной активности. Пероксидаза (ПО) участвует в реакции конденсации веществ при образовании молекул гуминовых кислот, принимает участие в окислительно-восстановительных процессах в почве. Этот фермент катализирует окисление полифенолов в присутствии перекиси водорода или органических перекисей, так как сами перекиси обладают сравнительно слабым окисляющим действием на фенолы. Ее влияние направлено на окисление гумусовых веществ. Полифенолоксидазы (ПФО) участвуют в превращении органических соединений ароматического ряда в компоненты гумуса. Низкие дозы загрязнения активизируют эти ферменты, средние и высокие дозы оказывают ингибирующее действие. Увеличение активности ПО объясняется включением фермента в процесс детоксикации, а ПФО — трансформацией продуктов нефтяного разложения в компоненты гумуса.

В первые 15 дней наблюдалось увеличение активности пероксидазы и полифенолоксидазы. В последующие дни регистрировалась стабилизация активности пероксидазы и снижение активности полифенолоксидазы (табл. 1).

Коэффициент гумификации это величина выражающая отношение активности ПФО к активности ПО и позволяющая судить о преобладании катализируемых процессов. В системе «почва + масло» наблюдалось резкое уменьшение коэффициента гумификации, что свидетельствует о преобладании процесса окисления гумусовых веществ над процессом гумификации почвы, таким образом качество почвы снижается в связи с загрязнением почвы. В системе «почва + масло + бактерии» падение коэффициента гумификации замедлялось в 2,5 раза после внесения живой культуры углеводородразлагающих бактерий, по мере отмирания клеток падение коэффициента гумификации возобновлялось в связи с присутствием в почве остаточных нефтепродуктов (рис. 4). Аналогично в системах «масло + опилки» и «масло + опилки + бактерии» наблюдалось замедление падения коэффициента гумификации в 1,1 и 1,9 раз, соответственно (рис. 5).

По литературным данным, разложение нефтяных углеводов бактериями происходит быстрее, когда нефть рассеивается под действием эмульгаторов в толще воды в виде капель [2]. Было

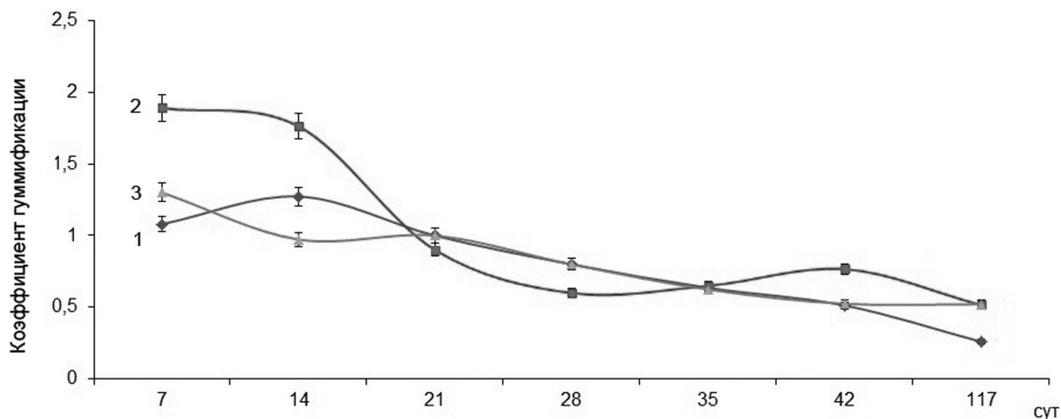


Рис. 4. Коэффициент гумификации (1 — почва без воздействия, 2 — система «масло», 3 — система «масло + бактерии»)

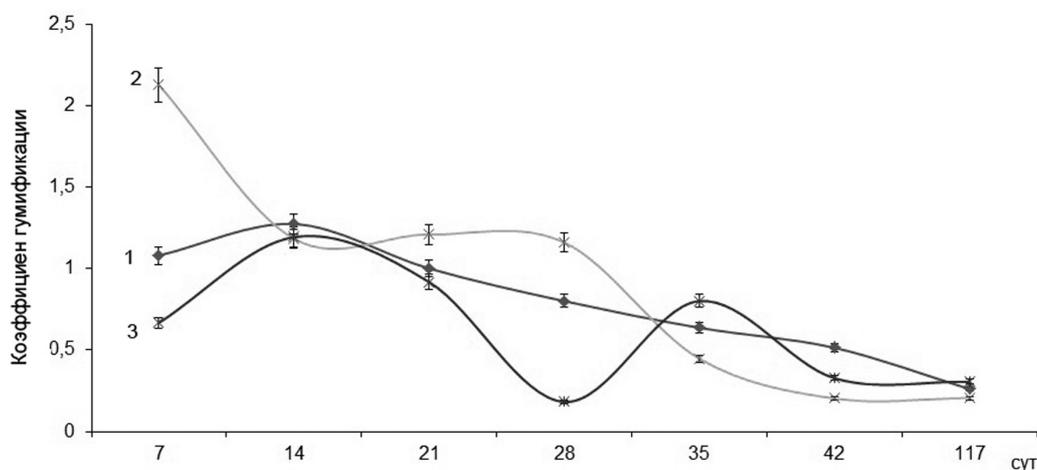


Рис. 5. Коэффициент гумификации (1 — почва без воздействия, 2 — система «масло + опилки», 3 — система «масло + опилки + бактерии»)

установлено, что при культивировании бактерий в присутствии гексадекана в качестве субстрата исследуемые штаммы проявляют эмульгирующую активность за счет синтеза биосурфактанта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе микрополевого эксперимента были получены следующие результаты:

Система «почва + масло + бактерии» оказалась наиболее эффективной по степени деградации нефтепродуктов, которая составила 48,37%. В этой системе наблюдали наибольший прирост общей численности клеток и увеличение коэффициента гумификации, что свидетельствует о положительной направленности гумусообразования, способствующего повышению плодородия почвы.

Выявлена способность штаммов *Acinetobacter* sp. 134 (B-3780), АСКС1 (B-2838) и ВСБ-567 (B-5064) к образованию биосурфактанта.

Это позволяет рекомендовать использование данных штаммов для биоремедиации загрязненных нефтепродуктами почв на территории Воронежской области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Armbruster E. H.* Improved technique for isolation and identification of *Sphaerotilus* / E. H. Armbruster. — *Appl. Microbiol.* — 1969. — Vol. 17. — P. 320—321.
2. *Christofi N.* Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation / N. Christofi, I.B. Ivshina // *J. Appl. Microbiol.* — 2002. — Vol. 93, №6. — P. 915—929.
3. *Gutnik D.* Perspectives on microbial surfactants / D. Gutnik, W. Minas // *Biochem. Soc. Transakt.* — 1987. — Vol. 15, № 6. — P. 19—35.
4. Oleophilic biofertilizer based on a *Rhodococcus* surfactant complex for the bioremediation of crude oil-contaminated soil / I.B. Ivshina [et al] // *Sediment and Water.* — 2001. — Vol. 1. — P. 20—24.
5. *Pfennig N. D.* Uber das vitamin B₁₂ — bedurfuis phototropher Schwefelbakterien / N.D. Pfennig, K.D. Lip-

pert // Arch. microbiol. — 1966. — Vol. 55, № 1. — P. 245—256.

6. Андресон Р. К., Хазиев Ф. Х., Дешура В. С. Способ рекультивации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. Патент российской федерации, 1997.

7. Кононова В. В. Сурфактантообразующая микрофлора: свойства и практическое использование / В. В. Кононова, А. С. Самсонова, Н. Ф. Семочкина // Микробные биотехнологии: фундаментальные и при-

кладные аспекты. Сборник научных трудов ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», 2007. — С. 350—365.

8. Методика выполнений измерений массовой доли нефтепродуктов в почвах и донных отложениях методом ИК-спектроскопии. ПНДФ 16.1:2.2.22—98. Москва. — 1998. — С. 15.

9. Хазиев Ф. Х. Методы почвенной энзимологии / Ф. Х. Хазиев. — М.: Наука, 2005. — 250 с.

Логинова Ольга Олеговна — магистрант 2-го года, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет; тел.: (951) 560-0270, e-mail: loginova00@gmail.ru

Loginova Olga O. — student, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University; tel.: (951) 560-0270, e-mail: loginova00@gmail.ru

Данг Тху Тхюи — аспирант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет; e-mail: dangthuthuy_booc@yahoo.com

Dang Thu Thuy — graduate student, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University; e-mail: dangthuthuy_booc@yahoo.com

Белюсова Елена Васильевна — аспирант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет; e-mail: curly_999@mail.ru

Belousova Elena V. — graduate student, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University; e-mail: curly_999@mail.ru

Грабович Маргарита Юрьевна — профессор, д.б.н., кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет; тел.: (905) 659-1525 e-mail: margarita_grabov@mail.ru

Grabovich Margarita Yu. — professor, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Doctor of Biology, Voronezh State University; e-mail: margarita_grabov@mail.ru