

УДК 579.22

DOI: 10.15587/2519-8025.2017.105525

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ АЗЕРБАЙДЖАНА

© И. Х. Бабаева, С. Ю. Касумова

Изучена зависимость между составом нефти трех изучаемых месторождений: Нафталанового и апшеронских – Биби-Эйбатского и Бинагадинского, и содержанием микробиоты в почве этих же месторождений. Обнаружено, что наибольшее количество углеводородокисляющих микроорганизмов выделялось из почв месторождения Бинагадинской нефти, богатого n-алканами, и меньшее – из Нафталановой и Биби-Эйбатской. Нефтезагрязненные почвы Апшерона отличились большим количеством выделенных микроорганизмов. У исследуемых активных штаммов отмечена конверсия нефти и её фракций
Ключевые слова: микроорганизмы, нефть, углеводороды, нефтезагрязненная почва, дегградация, микромицеты, фракции нефти, конверсия

1. Введение

Как известно, нефть и нефтепродукты признаны приоритетными загрязнителями окружающей среды в связи со значительной интенсификацией добычи нефти и производства нефтепродуктов. Большинство исследователей при оценке негативного влияния нефтяного загрязнения на почву и эффективности применяемых приемов рекультивации, основными учитываемыми параметрами считают содержание основных нефтепродуктов и общую микробиологическую активность почв [1, 2]. Изменение в антропогенных условиях бактериальной составляющей микробиоценозов привлекает внимание большей части исследователей. Гораздо меньше работ посвящено микроскопическим грибам – обитателям нефтезагрязненных почв (НЗП). В то время как грибы играют немаловажную роль в процессах самоочищения почв от загрязнения нефтью и нефтяными углеводородами, способствуя разрушению нефтяных загрязнений и вовлекая продукты распада нефти в естественный круговорот углерода [3–5].

2. Литературный обзор

В нефтезагрязненных почвах по сравнению с природными аналогами возрастает численность грибов и их значение в обмене органического вещества [6]. Они чувствительны к изменению свойств почвы под воздействием различных поллютантов, в том числе и нефти, и могут служить индикаторами ее состояния [7, 8].

Кроме того, большая часть циклических углеводородов является в биохимическом отношении весьма устойчивой и оказывает ядовитое антисептическое действие на организмы вообще и на микроорганизмы в частности [9]. Поэтому поиск и изучение микроорганизмов, способных использовать данные нефтяные углеводороды является чрезвычайно важным, так как изучение микроорганизмов, производящих эти процессы, условий, при которых эти процессы протекают, дают метод, с помощью которого возможно решение вопроса об очистке почв и водоемов, загрязненных отбросами нефтяных и химических заводов. В связи с этим, актуальное значение имеет выделение из почв микроорганизмов, обладающих

способностью избирательно использовать углеводороды нефти, выявлению их способности к специфическому использованию этих углеводородов в зависимости от строения и структуры.

3. Цели и задачи статьи

Цель исследования – изучение микроорганизмов различных НЗП Азербайджана.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделение микроорганизмов из почв месторождений нафталановой и апшеронских нефтей; Выделение микроорганизмов из месторождений нафталановой (почва и нефть) и апшеронских нефтей (почва)
2. Изучение зависимости между составом нефти трех изучаемых месторождений: Нафталанового и апшеронских – Биби-Эйбатского и Бинагадинского, и содержанием микробиоты в почве этих же месторождений;
3. Изучение конверсии нафталановой нефти и её фракций выделенными культурами микроорганизмов. Изучение конверсии нафталановой нефти и её фракций выделенными культурами микромицетов.

4. Материалы и методы исследования

В качестве исследуемого материала были использованы образцы почв трех изучаемых месторождений: Нафталанового и апшеронских- Биби-Эйбатского и Бинагадинского.

Выделение микроорганизмов из почвенных образцов и нефти проводили методом прямого посева почвы на чашки Петри с соответствующими агаризованными средами. Для выделения грибов использовали среду Чапека-Докса (г/л): вода дистиллированная – 1,0, сахара – 30,0, NaNO_3 – 2,0, K_2HPO_4 – 1,0, MgSO_4 – 0,5, KCl – 0,5, FeSO_4 – 0,01, агар – 15,0; для выделения бактерий- агаризованная среда Раймонда (г/л): Na_2CO_3 – 0,1, CaCl_2 – 0,01, MnSO_4 – 0,02, FeSO_4 – 0,01, MgSO_4 – 0,2, NH_4Cl – 0,2, NaCl – 3,0, Na_2HPO_4 – 1,5, KH_2PO_4 – 1,0, агар – 20,0. Температура инкубации 26–28 °С, длительность опыта от 7 до 30 суток [9].

Количественный учет углеводородокисляющих микроорганизмов проводили методом предель-

ных разведений жидких средах. Почвенные суспензии 10^{-1} - 10^{-8} разведений вносили на жидкие элективные среды. Из сред испытывали минеральную основу жидких сред Эшби (г/л): вода дистиллированная – 1,0(л), сахароза или маннит – 20,0, K_2HPO_4 – 0,2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2, NaCl – 0,2, K_2SO_4 – 0,1, $CaCO_3$ – 5,0; Чапека (г/л): вода дистиллированная – 1,0 (л), $NaNO_3$ – 2,0, K_2HPO_4 – 1,0, $MgSO_4$ – 0,5, KCl – 0,5, $FeSO_4$ – следы; Ридера (г/л): вода дистиллированная – 1,0 (л), $(NH_4)_2SO_4$ – 3,0, $MgSO_4$ – 0,7, $CaNO_3$ – 0,04, NaCl – 0,5, KH_2PO_4 – 1,0, K_2HPO_4 – 0,1 и Таусона (г/л): вода дистиллированная – 1,0 (л), KNO_3 – 0,25, $CaNO_3$ – 1, K_2HPO_4 – 0,25, KH_2PO_4 – 0,25 $MgSO_4$ – 0,25, $FeSO_4$ – 0,025, жидкую среду Раймонда. В качестве единственного источника углерода и энергии вносили нафталиновую нефть. Учет содержания микрофлоры проводили на 7-10-е сутки [9]. В каждом опыте контролем служили: минеральная среда, засеянная почвой, без углеводорода (контроль 1) и минеральная среда с углеводородом (контроль 2). Количество микроорганизмов определяли по таблице Мак-Крэди.

Идентификацию выделенных штаммов УОМ проводили на основании изучения морфологических, культуральных, физиолого-биохимических признаков в соответствии с общепринятыми методами [10–13].

Оценку способности роста на углеводородах (нефть, смесь алканов от C_{10} до C_{19} , бензол, толуол, циклогексан и нафталин) проводили при культивировании выделенных микроорганизмов на жидкой минеральной среде Чапека для грибов и Раймонда для бактерий. Источники углерода вносились в количестве 2 %. Выращивание проводилось в стационарных условиях при 28–32° в течение 15–30 суток. Выход мицелия определяли по весу сухой биомассы и выражали в г/л. О развитии бактерий судили по изменению оптической плотности (ОП) культур на приборе ФЭК-56 при длине волны 540 нм (светофильтр № 6) с применением кювет толщиной в 1 мл.

Определение конверсии проводили весовым методом. Для этого грибы культивировали 20 суток при температуре 26–28 °С в стационарных условиях на среде Чапека с нафталиновой нефтью и ее фракциями в количестве 2 % в качестве единственного источника углерода. опыты ставили в трехкратной повторности. Биомассу отделяли фильтрованием, используя бумажный фильтр. Для извлечения неиспользованной нефти применяли гексан. Отфильтрованную культуральную жидкость, после того как мицелий неоднократно промывали гексаном. Гексано-

вый экстракт сушили $CaCl_2$, отделяли деконтацией, осушитель ($CaCl_2$) промывали гексаном. Растворитель отгоняли в вакууме, остаток взвешивали [14].

5. Результаты исследования и их обсуждения

Для выяснения зависимости между составом нефти трех изучаемых месторождений: Нафталинового и апшеронских – Биби-Эйбатского и Бинагадинского, и содержанием микробиоты в почве этих же месторождений проводили количественный учет микроорганизмов. Нефти этих трех нефтеносных месторождений значительно отличаются по составу. Нефть Нафталинового месторождения обладает свойством тяжелых нефтей и отличается высоким содержанием нафтеновых углеводородов [15].

При приготовлении агаризованных сред применяли выщелоченный агар. Углеводороды вносили после стерилизации; в случае летучих углеводородов пробки колб и пробирок парафинировали.

Выращивание проводили при 28 °С. Пробы почвы для анализа отбирали в июле и марте, учет содержания микрофлоры проводили на 7–10-е сутки.)

Количественное содержание микроорганизмов в одних и тех же образцах в значительной мере зависело от состава среды выделения. Наибольшее количество микроорганизмов из четырех испытанных сред развивалось на минеральной среде Эшби с углеводородами.

Наибольшее количество углеводородоксилирующих микроорганизмов выделялось из почв месторождения Бинагадинской нефти, богатого н-алканами, и меньшее – из Нафталиновой и Биби-Эйбатской. Такое распространение объясняется составом нефти изучаемого месторождения, и эта зависимость наблюдалась на всех средах (табл. 1).

Среди выделенных культур микроорганизмов преобладали представители родов *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Torulopsis*, *Candida*, а среди грибов, главным образом, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*.

Все выделенные из нафталинового месторождения микроорганизмы хорошо усваивали н-алканы, главным образом, C_{15} - C_{17} (биомасса – 4–6 г/л), газоконденсат, керосин, дизельное топливо (биомасса – 1–5 г/л) и бинагадинскую нефть (биомасса – 3–5 г/л).

Таким образом, культуры, выделенные из нафталинового и апшеронских месторождений, проявили почти одинаковую активность, т. е. спектр потребления углеводородов не зависел от места выделения культур, а более активное накопление биомассы было отмечено при том составе среды и температуре, при которых культура изолировалась из субстратов.

Таблица 1

Учет углеводородоксилирующих микроорганизмов в почвах нефтеносных районов Азербайджана (КОЕ $\times 10^6$ /г почвы)

Минеральная среда	Нафталиновое	Биби-Эйбатское	Бинагадинское
Таусона	1,0	3	3
Чапека	2,5	3	20
Эшби	10	30	65
Ридера	1,3	3,5	15

В последнее время мицелиальные грибы вызывают особый интерес у исследователей процессов микробной трансформации углеводов (УВ) нефти из-за их избирательной способности в утилизации различных нефтяных углеводов [16]. Как известно, в состав нафталановой нефти, в основном, входят нафтеновые углеводороды, являющиеся действующим лечебным фактором, ароматические углеводороды, так называемые гибридные циклические углеводороды, а также смолы [15]. Такой состав нафталановой нефти затрудняет её деградацию микроорганизмами. В связи с этим, поиск культур микроорганизмов, способных к избирательной деградации нафталановой нефти, представляет теоретический, а с точки зрения изучения продуктов метаболизма и возможного получения ценных метаболитов и практический интерес. Поэтому, при изучении микроорганизмов НЗП Азербайджана особое внимание уделялось микромицетам.

Результаты экспериментов по выделению нафталанокисляющих грибов из различных источников представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, общее количество выделенных грибных штаммов составляет 108 (104).

Из нефтезагрязненных почв Апшерона выделено 69 штаммов, из почв месторождения нафталановой нефти – 21 штамм, из самой нафталановой нефти – 14 штаммов, из использованной нафталановой нефти – 4 штамма.

Предварительный отбор активных грибных культур по способности их роста на нафталановой нефти и выходу биомассы показал, что среди исследуемых грибных штаммов наибольшую активность проявляют *Penicillium* sp.3п, выделенный из почв месторождения нафталановой нефти, *Mucor* sp. 6н, выделенный из самой нафталановой нефти, *Fusarium* sp.11a и *Cephalosporium* sp.45a, выделенные из нефтезагрязненных почв Апшерона. Поэтому дальнейшее изучение конверсии проводили с этими штаммами. Результаты конверсии нафталановой нефти вышеуказанными штаммами представлены в табл. 3.

Как следует из табл. 3, все исследуемые штаммы разлагают такой сложный субстрат как нафталановая нефть. Максимальная степень конверсии – 43,6 % отмечена у *Penicillium* sp.3п, а минимальная у *Fusarium* sp.11a – 28 %. Определение же конверсии трех фракций нафталановой нефти показало следующие результаты (табл. 4).

Таблица 2

Количество нафталанокисляющих грибных штаммов, выделенных из различных источников

Субстрат выделения грибных культур	Общее число испытанных образцов	Общее число выделенных штаммов
1. Нефтезагрязненная почва Апшерона	25	69
2. Почва вблизи нафталанового месторождения	6	21
3. Нафталановая нефть	6	14
4. Использованная нафталановая нефть	1	4
Итого	38	104

Таблица 3

Потребление нефти нафталанокисляющими штаммами грибов

Название грибных штаммов	Внесено нефти, гр.	Осталось нефти, гр.	Потреблено, %	Выход биомассы, г/л
<i>Penicillium</i> sp. 3п	0,715	0,403	43	0,685
<i>Mucor</i> sp. 6н	0,715	0,502	30	0,610
<i>Cephalosporium</i> sp. 45a	0,715	0,492	35	0,627
<i>Fusarium</i> sp. 11a	0,715	0,515	28	0,542

Таблица 4

Потребление фракций нафталановой нефти нафталанокисляющими штаммами грибов

Название грибных штаммов	Фракции	Внесено фр., гр.	Осталось фр., гр.	Потреблено%	Выход биомассы г/л
<i>Penicillium</i> sp. 3п	№ 1	0,350	0,217	37,3	0,564
	№ 2	0,310	0,163	42,4	0,677
	№ 3	0,400	0,260	35,0	0,460
<i>Mucor</i> sp. 6н	№ 1	0,350	0,224	36,0	0,530
	№ 2	0,510	0,168	41,0	0,614
	№ 3	0,400	0,406	20,4	0,392
<i>Cephalosporium</i> sp. 45a	№ 1	0,350	0,270	34,0	0,432
	№ 2	0,310	0,173	38,6	0,594
	№ 3	0,400	0,276	31,0	0,420
<i>Fusarium</i> sp. 11a	№ 1	0,350	0,288	29,0	0,412
	№ 2	0,400	0,198	38,2	0,570
	№ 3	0,510	0,398	22,1	0,402

Примечание: фр. № 1 90–120 °С (1 мм рт. ст.), фр. № 2 125–150 °С (1 мм рт. ст.), фр. № 3 150–180 °С (1 мм рт. ст.)

Как видно из табл. 4, штаммы лучше всего потребляют II-ю фракцию нафталановой нефти – 38,6 % *Cephalosporium* sp.45a, 42,4 % – *Penicillium* sp.3п, 41 % – *Mucor* sp.6н, 38,2 % – *Fusarium* sp.11a. Ниже процент потребления I-й фракции – 37,3 % – *Penicillium* sp.3п, 36 % – *Mucor* sp.6н, 34 % – *Cephalosporium* sp.45a, 29 % – *Fusarium* sp.11a. Хуже всего штаммы потребляют III-ю фракцию – 35 % – *Penicillium* sp.3п, 31 % – *Cephalosporium* sp.45a, 20 % – *Mucor* sp.6н, 22 % – *Fusarium* sp.11a.

Таким образом, активность штаммов, выделенных из месторождения нафталановой нефти, превосходит активность штаммов, выделенных из нефтезагрязненных почв Апшерона в отношении испытанных углеводородных субстратов (нафталановой нефти и её фракций), хотя здесь наблюдается преимущество родового многообразия.

6. Выводы

1. Из месторождений Бинагадинской, Биби-Эйбатской и Нафталановой нефти выделено 108 (104) грибных штаммов. Из нефтезагрязненных почв

Апшерона выделено 69 штаммов, из почв месторождения нафталановой нефти – 21 штамм, из самой нафталановой нефти – 14 штаммов, из использованной нафталановой нефти – 4 штамма.

2. Наибольшее количество углеводородокисляющих микроорганизмов выделялось из почв месторождения Бинагадинской нефти, богатого н-алканами, и меньшее – из Нафталановой и Биби-Эйбатской. Такое распространение объясняется составом нефти изучаемого месторождения. В результате исследований особых различий в разнообразии микробиоты трех месторождений не было выявлено. Среди выделенных культур микроорганизмов преобладали представители родов *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Torulopsis*, *Candida*, а среди грибов, главным образом, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Alternaria*.

3. Изучение конверсии нафталановой нефти и её фракций культурами микромицетов (микроорганизмов) показало, что максимальная степень конверсии отмечена у *Penicillium* sp.3п, выделенного из почв месторождения нафталановой нефти.

Литература

1. Керимов, С. В. Функционально-экологическая оценка почв Апшеронского полуострова, загрязненных нефтепродуктами [Текст] / С. В. Керимов, Н. М. Исмаилов, И. И. Васнев // *АгроЭкоИнфо*. – 2008. – № 2. – Режим доступа: http://agroecoinfo.narod.ru/journal/STATYI/2008/2/st_21.doc
2. Шаронова, Н. Л. Экология почвенной микробиоты и диагностики почв [Текст] / Н. Л. Шаронова, В. М. Пахомова. – Казань: Каз ГАУ, 2009. – 224 с.
3. Корнейкова, М. В. Комплексы микроскопических грибов в загрязненных нефтепродуктами агроземах в условиях Кольского Севера [Текст] / М. В. Корнейкова // *Микология и фитопатология*. – 2011. – Т. 45, № 3. – С. 249–256.
4. Гоголева, О. А. Углеводородокисляющие микроорганизмы природных экосистем [Текст] / О. А. Гоголева, Н. В. Немцева // *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал)*. – 2012. – № 2. – С. 1–6.
5. Зайцева, Т. А. Микроорганизмы-деструкторы нефти [Текст] / Т. А. Зайцева, Л. В. Рудакова, М. М. Комбарова и др. // *Научные исследования и инновации*. – 2010. – № 4. – С. 59–63.
6. Аюпова, А. Ж. Определение деструктивного потенциала штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов по отношению к углеводородам нефти [Текст] / А. Ж. Аюпова, Г. Ж. Нагметова, А. С. Сарсенова, А. А. Курманбаев // *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук*. – 2015. – № 1. – С. 34–36.
7. Петров, А. М. Эколого-физиологическое состояние микробных сообществ различных типов почв, загрязненных нефтью [Текст]: тезисы докл. межд. конф. / А. М. Петров // *Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред*, 2013. – С. 164.
8. Зейферт, Д. В. Характер зависимости между концентрацией нефти в почве и ее токсичностью [Текст] / Д. В. Зейферт, Л. М. Гамерова // *Экологический вестник России*. – 2012. – № 12. – С. 16–19.
9. Методы экспериментальной микологии [Текст] / под общ. ред. В. И. Билай. – Киев: Наук. Думка, 1982. – 552 с.
10. Литвинов, М. А. Определитель микроскопических почвенных грибов [Текст] / М. А. Литвинов. – Л.: Изд-во «Наука», 1967. – 303 с.
11. Определитель бактерий Берджи: в двух томах [Текст] / под ред. Дж. Хоула, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997. – 800 с.
12. Лысак, Л. В. Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий [Текст] / Л. В. Лысак, Т. Г. Добровольская, И. Н. Скворцова. – М.: МАКС Пресс, 2003. – 123 с.
13. Бабьева, И. П. Методы выделения и идентификации дрожжей [Текст] / И. П. Бабьева, В. И. Голубев. – М.: Пищевая пром-сть, 1979. – 120 с.
14. Красильников, Н. Р. Разложение нефти парафинокисляющими микобактериями [Текст] / Н. Р. Красильников, Т. В. Коронелли // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1974. – Т. X, № 4. – С. 573–576.

15. Аббасов, В. М. Отличительные особенности лечебной нафталанской нефти от некоторых промышленных нефтей Азербайджана [Текст] / В. М. Аббасов, А. П. Гасанов, Д. Н. Мамедов, Н. Н. Мусаев, Г. А. Наджафова, Н. Р. Абдуллаева // Процессы нефтехимии и нефтепереработки. – 2005. – № 3 (22). – С. 32–34.

16. Нечай, Н. Л. Микромицеты – деструкторы углеводов [Текст]: матер. VII Моск. Межд. Конгресса / Н. Л. Нечай, А. А. Какимжанова, Т. С. Еремеккалиев // Биотехнология: Состояние и перспективы развития. – 2015. – Т. 2. – С. 370–372.

Дата надходження рукопису 11.05.2017

Бабаева Ирада Халид кызы, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Институт Микробиологии Национальной Академии Наук Азербайджана, Микаил Мушфиг, 103, Сабаил, Баку, Азербайджан, AZ1073
E-mail: babayevairada@mail.ru

Касумова Светлана Юсиф кызы, доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией, Лаборатория «Экспериментальной микологии», Институт Микробиологии Национальной Академии Наук Азербайджана, Микаил Мушфиг, 103, Сабаил, Баку, Азербайджан, AZ1073
E-mail: kasumova-kasumova@mail.ru