

ISSN 2304-9081

**Учредители:**  
**Уральское отделение РАН**  
**Оренбургский научный центр УрО РАН**

***Бюллетень***  
***Оренбургского научного центра***  
***УрО РАН***  
***(электронный журнал)***



***2013 \* № 1***

**On-line версия журнала на сайте**  
**<http://www.elmag.uran.ru>**

© О.А. Гоголева, 2013

УДК 57.083.133

О.А. Гоголева

## **ПОТРЕБЛЕНИЕ НЕФТИ СОРОЧИНСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ УГЛЕВОДОРОД-ОКИСЛЯЮЩИМИ ШТАММАМИ GORDONA TERRAE И ACINETOBACTER SP.**

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, г. Оренбург, Россия

Изучена способность углеводородоокисляющих бактерий *Gordona terrae* и *Acinetobacter sp.* к деструкции нефти Сорочинского месторождения, а также динамика каталазной активности в процессе потребления углеводородов. Экспериментально установлено, что по мере потребления углеводородов наблюдается снижение каталазной активности штаммов-деструкторов. Установлена прямая зависимость между уровнем каталазной активности углеводородоокисляющих бактерий и снижением концентрации нефти в среде. Полученные результаты могут иметь практическое значение.

*Ключевые слова:* углеводородоокисляющие бактерии, численность, деструкция нефти, каталазная активность.

О.А. Gogoleva

## **CONSUMPTION OF OIL FROM SOROCHINSK FIELD BY THE HYDROCARBON-OXIDIZING STRAINS GORDONA TERRAE AND ACINETOBACTER SP.**

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

The ability of *Gordona terrae* and *Acinetobacter sp.* to consume the oil from Sorochinsk field is studied. The dynamics of catalase activity during hydrocarbon consumption is examined. During hydrocarbon destruction the decreasing of catalase activity of strains-destructors is established experimentally. A direct relationship between catalase activity level of hydrocarbon-oxidizing microorganisms and the decreasing of oil concentration in the medium is established. These results may have practical significance.

*Ключевые слова:* hydrocarbon\_oxidizing bacteria, quantity, destruction of oil, catalase activity.

### **Введение.**

Поступление в окружающую среду, как нефти, так и продуктов ее переработки ежегодно приводит к увеличению антропогенно загрязненных территорий. В связи с этим особую значимость приобретает изучение микроорганизмов, способных осуществлять биодеструкцию углеводородов.

Для аэробных микроорганизмов важнейшим фактором успешного окисле-

ния нефти и нефтепродуктов является достаточное содержание кислорода, необходимого для преобразования нефтяных фракций [1]. Кислород участвует в процессах окисления углеводородов, так как последние не окисляются непосредственно дегидрогеназами бактерий. Для их разложения необходим начальный этап активации – превращение с участием кислорода и кислорода в спирты [2, 3].

Окисление углеводородов происходит по свободно-радикальному механизму и является цепной реакцией, инициатором которой выступает кислород [4, 5]. Первичным молекулярным продуктом является гидропероксид или пероксид. Образование свободных радикалов из продуктов, образующихся в цепной реакции окисления, в частности пероксидов, приводит к ускорению цепного окисления [6, 7]. В защите клеток от действия пероксидов принимает участие каталаза, однако данных об изменении каталазной активности в литературе нет, поэтому целью нашего исследования стало изучение динамики каталазной активности углеводородокисляющих бактерий в процессе потребления нефти.

#### **Материалы и методы.**

Для экспериментальных исследований были отобраны чистые культуры углеводородокисляющих бактерий *Acinetobacter sp.* ИКВС № 2122 и *Gordona terrae* ИКВС № 19, выделенные нами ранее из природной среды и содержащиеся в лабораторных условиях.

Для выращивания культуры *Acinetobacter sp.* использовали мясопептонный агар, культивирование штамма *G. terrae* осуществляли на модифицированном агаре Чапека [8]. Культуры выращивали при температуре 25-27°C, в течение 24 часов. Через 24 часа из выросших культур готовили взвесь по стандарту мутности БАК-5 (ГИСК им. Л.А. Тарасевича).

Культивирование бактерий с нефтью Сорочинского месторождения (Сорочинский район Оренбургской обл.) проводили на жидкой минеральной среде Раймонда [8]. Колбы (V 500 мл), заполняли средой Раймонда в объеме 250 мл, в которую вносили микробную взвесь в количестве 1 см<sup>3</sup> так, чтобы конечная концентрация бактерий составила 10<sup>6</sup> кл/см<sup>3</sup>. В качестве единственного источника углерода в среду добавляли 1 см<sup>3</sup> нефти Сорочинского месторождения, при этом конечная концентрация во флаконе составляла 750,0±0,5 мг/дм<sup>3</sup>. Эксперимент проводили в течение 35 суток, инкубацию образцов осуществляли при температуре 25-27°C в условиях естественного освещения. Динамику численности бактерий учитывали чашечным методом. Подсчет выросших на чашках

колоний осуществляли в автоматическом режиме с помощью счетчика колоний ProtoCOL HR (Великобритания).

Содержание нефти в опытных образцах определяли в аккредитованном испытательном центре ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Оренбургской области» с помощью флуориметрического метода на жидкостном анализаторе «Флюорат – 02». Для этого 100 мл культуральной жидкости переносили в делительную воронку, отбирали 10 мл гексана и ополаскивали им сосуд, в котором находилась проба, затем гексан помещали в делительную воронку. Смесь перемешивали 30 сек, отстаивали до появления прозрачного верхнего слоя, который отделяли, помещали в кювету и измеряли концентрацию нефти в экстракте. Водную фазу отбирали в цилиндр и точно фиксировали ее объем.

Концентрацию нефти рассчитывали по формуле:

$$X_{\text{пр}} = (X_{\text{изм}} \times V_{\text{г}} \times K_1) / V_{\text{пр}},$$

где:

$X_{\text{пр}}$  – концентрация нефти в пробе воды, мг/мл;

$X_{\text{изм}}$  – концентрация нефти в растворе гексана, измеренная на приборе, мг/л;

$V_{\text{г}}$  – объем гексана, взятый для экстракции, мл;

$V_{\text{пр}}$  – объем пробы, мл;

$K_1$  – степень разбавления экстракта.

Содержание нефти в исследуемом образце выражали в процентах от исходной концентрации.

Наличие и уровень каталазной активности углеводородокисляющих бактерий определяли фотометрически по методике Бухарина О.В. с соавт. [9]. Для этого исследуемые штаммы микроорганизмов высевали из опытных образцов на мясопептонный агар или агар Чапека, не содержащих нефть. Посевы инкубировали в течение 2 суток при температуре 25°C, затем из выросших колоний делали взвесь с оптической плотностью 0,2 усл. ед. (при длине волны 492 нм). К 0,2 мл полученной взвеси исследуемого штамма добавляли 1 см<sup>3</sup> свежеприготовленного 0,0125М раствора пероксида водорода и инкубировали 10 мин при комнатной температуре, реакцию разложения пероксида водорода каталазой останавливали добавлением 5 капель 2Н раствора соляной кислоты. Затем добавляли 1 мл свежеприготовленного 0,025М раствора иодида калия, тщательно

перемешивали и осаждали клетки исследуемого штамма центрифугированием в течение 15 мин при 3000 g. Через 10 мин после центрифугирования измеряли светопоглощение образовавшегося в надосадочной жидкости комплекса йод - йодид калия (при длине волны 492 нм в плоскодонном полистироловом 96-луночном планшете с ячейкой объёмом 0,25 мл на фотометре «ИФА-ОЭП»).

Расчет активности каталазы проводили по формуле:

$$A_{\text{кат}} = (12.5 \times (1 - \text{ОД}_{\text{оп}} / \text{ОД}_{\text{к}}) / T \times \text{ОД}_{\text{м}}),$$

где:

$A_{\text{кат}}$  – активность каталазы в микромоль/мин•ОД;

$\text{ОД}_{\text{оп}}$  – оптическая плотность комплекса йод – йодид калия в опыте;

$\text{ОД}_{\text{к}}$  – оптическая плотность комплекса йод-йодид калия в контроле, полученном путём смешивания исходных объёмов растворов пероксида водорода, йодида калия и соляной кислоты;

$T$  – время инкубации исследуемой культуры с пероксида водорода;

$\text{ОД}_{\text{м}}$  – оптическая плотность микробной взвеси, взятой для определения каталазной активности;

Каталазную активность исследуемой культуры бактерий выражали в процентах от исходного уровня.

### **Результаты и обсуждение.**

*Динамика численности микроорганизмов при деструкции дизельного топлива.* Максимальные значения численности монокультуры штамма *G. terrae* (контроль 1) при потреблении нефти Сорочинского месторождения наблюдались к 12 суткам культивирования, при этом численность бактерий увеличивалась на один порядок по сравнению с исходными значениями. К концу эксперимента (35 сутки) численность незначительно снижалась (рис. 1).

При потреблении нефти Сорочинского месторождения монокультурой штамма *Acinetobacter sp.* (контроль 2) численность бактерий увеличивалась более чем на два порядка, достигая максимальных значений к 12 суткам, после чего наблюдалось резкое снижение численности *Acinetobacter sp.* (контроль 2), которая к 35 суткам возвращалась к исходным значениям.

При совместном культивировании штаммов *Acinetobacter sp.* и *G. terrae* на нефти Сорочинского месторождения численность штамма *G. terrae*, также как и в контроле 1, достигла максимальных значений к 12 суткам, увеличиваясь на один порядок, а затем постепенно снижаясь. Численность *Acinetobacter sp.* в

условиях сокультивирования с *G. terrae* достигла максимальных значений быстрее, чем в монокультуре (контроль 2), и уже к 6 суткам увеличилась более чем на два порядка. После 6 суток эксперимента численность *Acinetobacter sp.* плавно снижалась вплоть до 35 суток.

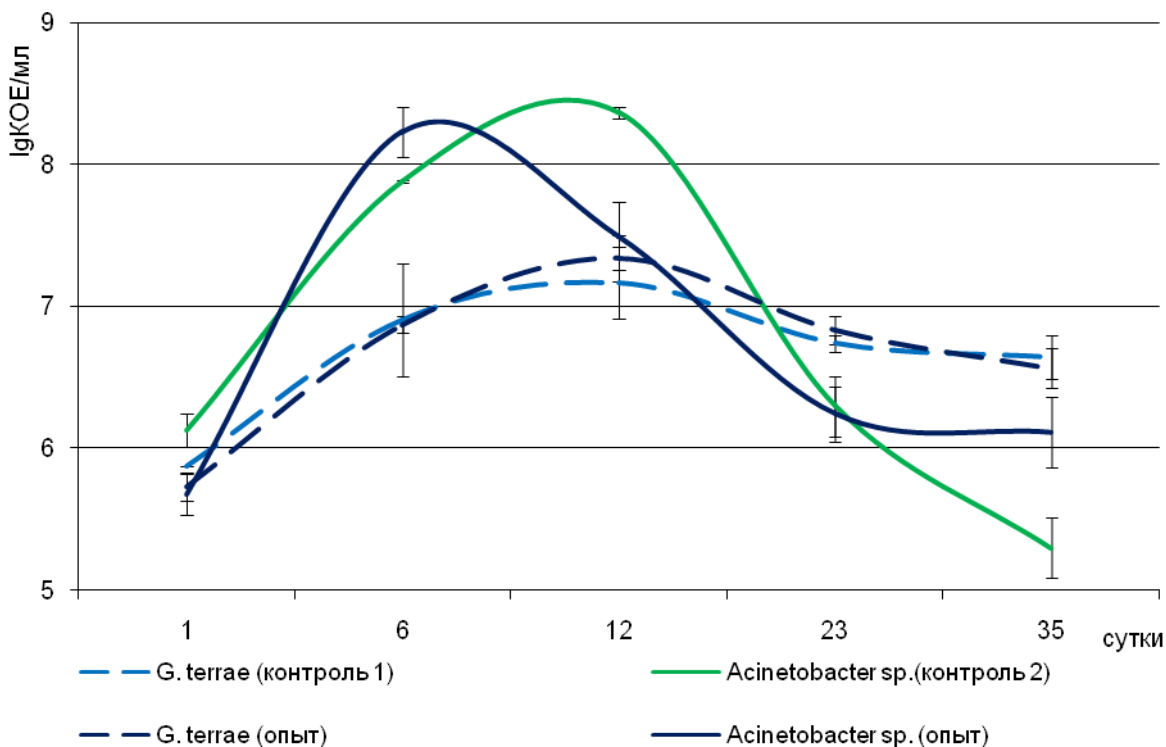


Рис. 1. Динамика численности (lgКОЕ/мл) углеводородокисляющих бактерий при потреблении нефти Сорочинского месторождения.

Изменение численности *Acinetobacter sp.* и *G. terrae* в процессе деструкции нефти Сорочинского месторождения свидетельствует о различной скорости потребления углеводов исследуемыми бактериями. Выявленные различия в скорости роста исследуемых культур бактерий в условиях их сокультивирования позволяют предположить, что штаммы микроорганизмов потребляют разные фракции нефти.

*Потребление микроорганизмами нефти Сорочинского месторождения.* На следующем этапе эксперимента проведено определение интенсивности потребления нефти исследуемыми штаммами бактерий. Первоначальная концентрация нефти в среде составляла  $750,0 \pm 0,5$  мг/дм<sup>3</sup>, что соответствовало 100% содержания нефти в исходной среде. Для учета испаряемости нефти был поставлен контроль 3 – минеральная среда Раймонда с добавлением нефти Сорочинского месторождения без культур микроорганизмов.

Наиболее интенсивное снижение углеводов, в первые 12 суток, на-

блюдали в эксперименте (контроль 2) со штаммом *Acinetobacter sp.* (рис. 2). Уже к шестым суткам содержание нефти в опыте с *Acinetobacter sp.* составило  $66,8 \pm 2,3\%$  от первоначального уровня, затем интенсивность потребления нефти уменьшалась и к 35 суткам содержание нефти составило  $56,0 \pm 2,6\%$  от первоначального уровня. В опытах со штаммом *G. terrae* (контроль 1) динамика потребления нефти была иной. К шестым суткам данные бактерии потребили углеводов меньше, чем *Acinetobacter sp.*, но после 12 суток интенсивность их потребления нефти продолжала увеличиваться, и к концу эксперимента содержание нефти в среде составило  $29,9 \pm 2,6\%$  от первоначального уровня.

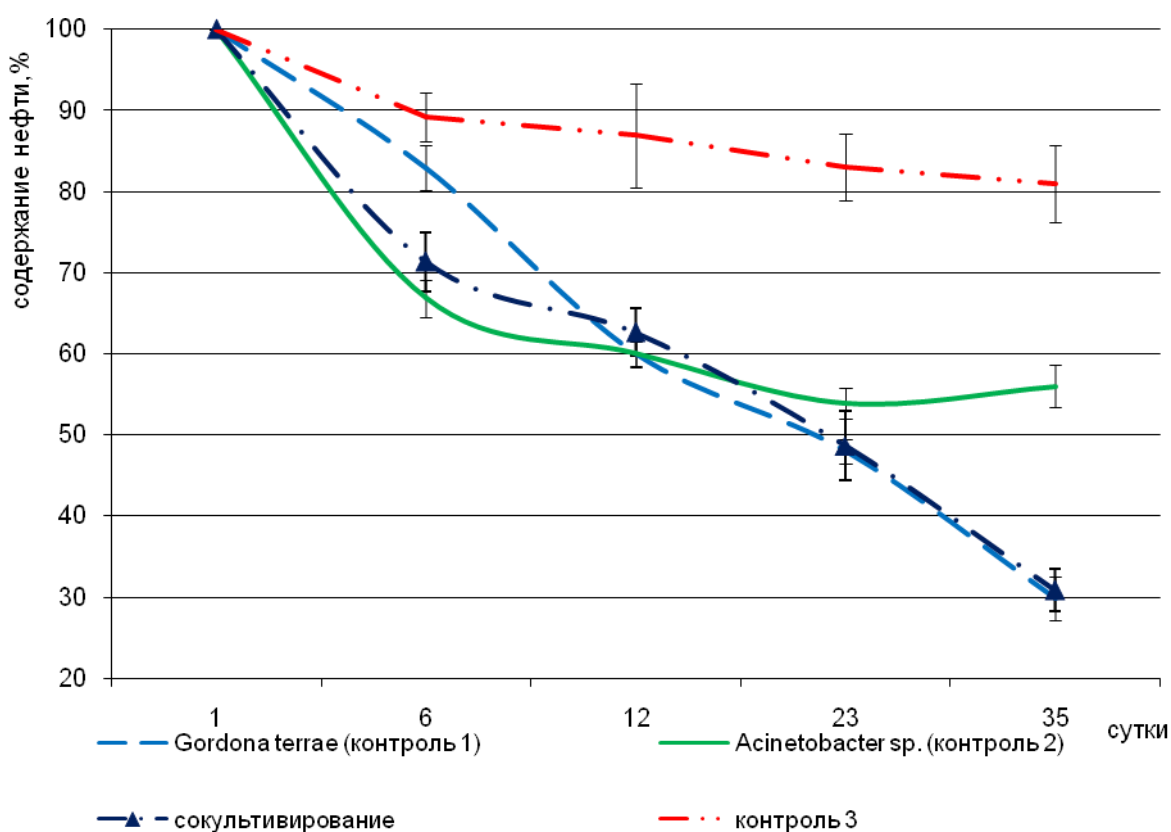


Рис. 2. Содержание нефти (%) Сорочинского месторождения при разных вариантах эксперимента.

В условиях совместного культивирования штаммов *Acinetobacter sp.* и *G. terrae* на нефти Сорочинского месторождения интенсивность микробного потребления углеводов в первые 12 суток была сопоставима с контролем 2 (штамм *Acinetobacter sp.*), а после 12 суток – с контролем 1 (штамм *G. terrae*). Подобная динамика снижения углеводов в среде культивирования, очевидно, связана с потреблением разных фракций нефти исследуемыми штамма-

ми, что особенно ярко выражено при их совместном культивировании.

Таким образом, установлено, что в лимитирующих условиях оба исследованных штамма бактерий способны к потреблению нефти Сорочинского месторождения, однако по сравнению с *Acinetobacter sp.* более высокую убыль углеводов обеспечивала монокультура *G. terrae* (контроль 1), а также ассоциация штаммов *G. terrae* и *Acinetobacter sp.*

*Динамика каталазной активности микроорганизмов в процессе деструкции нефти Сорочинского месторождения.* В ходе эксперимента определялась динамика каталазной активности исследуемых штаммов бактерий в условиях потребления нефти. Исходная каталазная активность у *Acinetobacter sp.* составила  $4,8 \pm 0,4$  усл.ед., а у *G. terrae* –  $3,3 \pm 0,06$  усл.ед., что в обоих случаях соответствовало 100%. В эксперименте каталазная активность штамма *Acinetobacter sp.*, как в монокультуре, так и при сокультивировании, была выше, чем у штамма *G. terrae* (рис. 3).

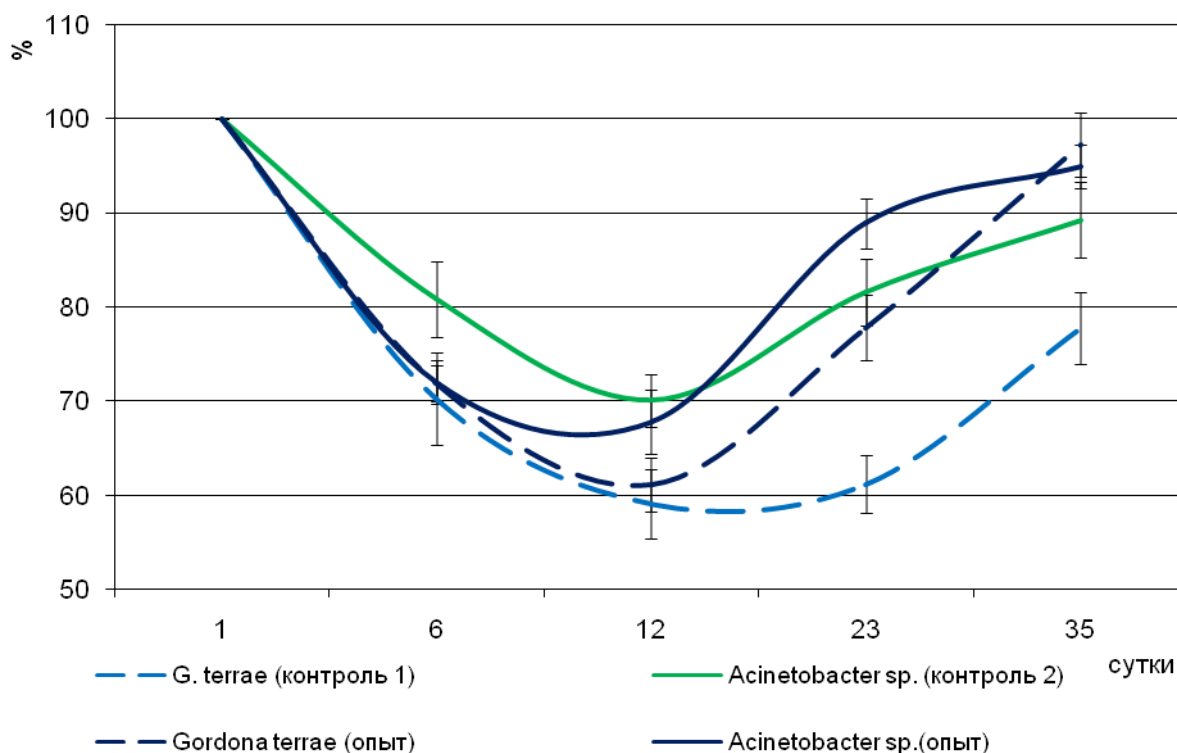


Рис. 3. Динамика каталазной активности (%) штаммов микроорганизмов при потреблении нефти Сорочинского месторождения.

При совместном культивировании штаммов на нефти Сорочинского месторождения снижение каталазной активности штаммов происходило более интенсивно, чем в экспериментах с монокультурами. Снижение каталазной активности у *Acinetobacter sp.* (контроль 2) к 6 суткам произошло на  $19,2 \pm 4,0\%$  от



исходного уровня, тогда как в эксперименте при сокультивировании бактерий уменьшение у них каталазной активности к этому сроку было более интенсивным – на  $28,1 \pm 2,3$  % от исходного уровня. Максимальное снижение каталазной активности у *Acinetobacter sp.* наблюдали на 12 сутки, как в контроле (на  $30 \pm 2,8$  %), так и в опыте (на  $32,3 \pm 3,4$  %).

У штамма *G. terrae* разница между снижением каталазной активности в опыте и контроле наблюдали после 12 суток. В эксперименте при сокультивировании бактерий каталазная активность *G. terrae* после 12 суток уменьшалась, а к 23 суткам ее снижение достигало  $22,3 \pm 3,5$  % от исходного уровня, тогда как в контроле оно составило  $38,9 \pm 3,1$  %. Следует отметить, что максимальное снижение каталазной активности штамма *G. terrae* регистрировали на 12 сутки как в контроле (на  $41,0 \pm 3,7$  %), так и опыте (на  $38,9 \pm 2,9$  %).

Иначе говоря, при совместном культивировании *Acinetobacter sp.* и *G. terrae* в первые шесть суток приоритет имеет *Acinetobacter sp.*, что подтверждается динамикой численности бактерий, интенсивностью снижения у них каталазной активности и данными химического анализа.

Анализ корреляционной зависимости между снижением каталазной активности штаммов бактерий (доли от исходного уровня) и снижением концентрации нефти Сорочинского месторождения в среде культивирования (доли от исходного уровня) показал сильную положительную связь между этими показателями для исследованных штаммов *Acinetobacter sp.* ИКВС № 2122 ( $r=0,87$ ;  $p=0,05$ ) и *Gordona terrae* ИКВС № 19 ( $r=0,90$ ;  $p=0,05$ ).

В результате исследования установлено, что исследуемые штаммы *G. terrae* и *Acinetobacter sp.*, как в монокультурах, так и ассоциации, могут использовать нефть Сорочинского месторождения в качестве единственного источника углерода и энергии. При этом они, вероятно, потребляют различные углеводороды, входящие в ее состав, о чем свидетельствуют данные, полученные в ходе эксперимента. Представленные результаты использованы при разработке способа выбора штаммов-деструкторов нефти и нефтепродуктов [10].

*(Работа выполнена по проекту № 12-П-4-1039 Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» и проекту молодых ученых и аспирантов УрО РАН № 13-4-НП-401)*

#### **ЛИТЕРАТУРА.**

1. Миронов О.Г. Бактериальная трансформация нефтяных углеводородов в прибрежной зоне морей. Морской экологический журнал. 2002. Т. 1. № 1: 56-66.

2. Жуков Д.В., Мурыгина В.П., Калюжный С.В. Механизмы деградации углеводов нефти микроорганизмами. Успехи современной микробиологии. 2006. Т. 126. № 3: 285-296.
3. Maeng J.H., Sakai Y., Tani Y., Kato N. Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of n-alkane oxidation in Acinetobacter sp. strain M-1. J. Bacteriol. 1996. V. 178. №. 13: 3695 - 3700.
4. Эммануэль Н.М., Кнорре Д.Г. Курс химической кинетики. М.: Высш. шк., 1984. 463 с.
5. Мочалова О.С., Антонова Н.М., Гурвич Л.М. Роль диспергирующих средств в процессах трансформации и окисления нефти в водной среде. Водные ресурсы. 2002. Т. 29. № 2: 221-225.
6. Rojo F. Degradation of alkanes by bacteria. Environmental Microbiology. 2009. V. 11 (10): 2477–2490.
7. Петров А.А. Углеводороды нефти. М.: Наука, 1984. 264 с.
8. Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989. 288 с.
9. Бухарин О.В., Черкасов С.В., Сгибнев А.В., Забирова Т.М., Иванов Ю.Б. Влияние микробных метаболитов на активность каталазы и рост Staphylococcus aureus 6538 P. Бюлл. эксп. биол. 2000. Т. 130. № 7: 80 - 82.
10. Немцева Н.В., Гоголева О.А., Бухарин О.В. Способ выбора штаммов микроорганизмов-деструкторов нефти и нефтепродуктов. Патент РФ на изобретение № 2426781 от 20.08.2011. Бюл. 2011. №23.

*Поступила 27.03.2012*

*(Контактная информация: Гоголева Ольга Александровна - к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории водной микробиологии Института клеточного и внутриклеточного симбиоза; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел. (3532) 775417; E-mail: [olik-g@yandex.ru](mailto:olik-g@yandex.ru))*