

Калбаева А.М., Цуркан Я.С.,
Карпенюк Т.А., Гончарова, А.В.

**Идентификация
нефтеокисляющих
микроорганизмов, выделенных
из вод нефтеносных районов
полуострова Бузачи**

Kalbayeva A.M., Tsurkan Y.S.,
Karpenyuk T.A., Goncharova A.V.

**Identification of oil-oxidizing
microorganisms isolated from the
water oil-bearing regions of the
peninsula Buzachi**

Қалбаева Ә.М., Цуркан Я.С.,
Карпенюк Т.А., Гончарова А.В.

**Бозащы түбегінің мұнайлы
аймақтарының жағалау
суынан бөлініп алынған
мұнай тотықтырушы
микроорганизмдерін
идентификациялау**

Объектом исследования послужили культуры бактерий и дрожжей, выделенные из прибрежной зоны Каспийского моря, прилегающей к месторождениям нефти в районе полуострова Бузачи. 8 культур продемонстрировали активный рост на среде, содержащей сырую нефть, дизельное топливо и бензин. Идентификация данных культур, проведенная с использованием, морфологических, физиологических и биохимических характеристик, а также методом определения нуклеотидной последовательности фрагмента 16S rRNA гена показала, что они относятся к бактериям рода *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Ochrobactrum*, *Klebsiella*, *Lysinibacillus*, *Erwinia* и дрожжам рода *Yarrowia*.

Ключевые слова: автохтонная микрофлора, углеводородокисляющие микроорганизмы, нефть, нефтепродукты.

The objects of study were the cultures of bacteria and yeast isolated in the coastal zone of the Caspian Sea, adjacent to the oil fields on the peninsula Buzachi. 8 dominant cultures of microorganisms, demonstrating strong growth in medium containing crude oil, from local field, diesel and gasoline were isolated from water samples taken from peninsula Buzachi region of the Caspian Sea. Identification of these cultures according standard morphological, physiological and biochemical characteristics showed that they belong to the bacteria genera *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Ochrobactrum*, *Klebsiella*, *Lysinibacillus*, *Erwinia* and the yeast genus *Yarrowia*.

Key words: autochthonous microflora, oil-oxidizing microorganisms, oil, oil products.

Зерттеу объектісі ретінде Бозащы түбегінің мұнай кен орындары аймағындағы Каспий теңізі жағасынан бөлініп алынған бактериялар мен ашытқылар қолданылды. 8 культура құрамында мұнай, дизельді жанармай және бензин бар қоректік орталарда белсенді өсу қабілетін көрсетті. Берілген культуралардың морфологиялық, физиологиялық және биохимиялық көрсеткіштері бойынша, сондай-ақ олардың гендерінің 16 S rRNA фрагменттерінің нуклеотидтік тізбегін анықтау арқылы олардың *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Ochrobactrum*, *Klebsiella*, *Lysinibacillus*, *Erwinia* туысына жататын бактериялар мен *Yarrowia* туысына жататын ашықты болып табылатындығы анықталды.

Түйін сөздер: автохтонды микрофлора, көмірсутектотықтырушы микроорганизмдер, мұнай, мұнай өнімдері.

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ
НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ
МИКРООРГАНИЗМОВ,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВОД
НЕФТЕНОСНЫХ
РАЙОНОВ
ПОЛУОСТРОВА
БУЗАЧИ**

Введение

Нефть – самый распространенный источник топлива в мире и относится к наиболее описанным загрязнителям биосферы. Несмотря на то, что технологические процессы при добыче нефти постоянно совершенствуются, опасность аварийных разливов и возникающих от этого последствий весьма актуальна, в том числе для Казахстана, одного из поставщиков нефти на мировом рынке [1].

Анализ динамики изменения экосистемы Каспия позволяет отнести нефтяное загрязнение к одному из основных факторов, определяющих нынешнее экологическое состояние моря [2].

Роль микроорганизмов в процессах превращения и ассимиляции нефти в морской экосистеме уникальна и может быть повышена за счет двух подходов: биоаугментации и биостимуляции. Использование аборигенной микрофлоры для очистки загрязненной нефтью и нефтепродуктами воды имеет ряд преимуществ, поскольку позволяет избежать необходимости учета климатических условий региона Каспийского моря; свойств добываемой на Казахстанском шельфе нефти, температурных и физических параметров очищаемой среды, проблем взаимодействий и уживаемости применяемых микроорганизмов с другой аборигенной микрофлорой очищаемого объекта. Использование биохимических возможностей автохтонных микроорганизмов, отбор наиболее устойчивых, активных культур и создание условий, которые способствуют более полному окислению или нейтрализации токсических органических соединений, позволят интенсифицировать процесс очистки [3-7].

Данная работа посвящена оценке углеводородоксиляющего потенциала микроорганизмов Казахстанской территории шельфа Каспийского моря с целью дальнейшей разработки на их основе эффективных препаратов для активизации процесса очистки водной акватории.

Материалы и методы

Пробы воды были отобраны по стандартным методикам в прибрежной зоне Каспийского моря, прилегающей к месторож-

дениям нефти в районе г. Актау [8]. Для выделения культур микроорганизмов с углеводородокисляющими свойствами использовали метод накопительных микробных культур [8], с добавлением в среду культивирования 1% нефти как единственного источника углерода и энергии. Культивирование проводили при температуре 25 – 28°C на качалке при 220 об/мин. в течение 14 суток. Из накопительной культуры производили высеивание на плотную универсальную среду с нефтью. Из выросших колоний выделяли культуры, чистоту которых дополнительно проверяли микроскопированием [8]. Динамику роста культур оценивали нефелометрически по изменению оптической плотности суспензии (фотоэлектроколориметрирование при длине волны 590 нм) в процессе культивирования в жидкой синтетической среде Е-8, с рН 6,5-7,0 (на качалке при 220 об/мин), с добавлением в качестве источника углерода нефти или других углеводов. Начальное значение оптической плотности культуры, взятой в эксперимент было 0,2, что соответствовало количеству клеток в интервале от $1,4 \times 10^6$ до $1,8 \times 10^6$ кл/мл для бактерий, а для дрожжей 2×10^6 - 3×10^6 кл/мл. Коэффициент корреляции между показателем оптической плотности и количеством клеток микроорганизмов варьировал в пределах 0,89-0,97 в зависимости от культуры.

Предварительную идентификацию выделенных микроорганизмов проводили по культурально-морфологическим (окраска по грамму, спорообразование, подвижность, форма клеток) и физиолого-биохимическим признакам (катазная, оксидазная, амилазная активности, окисление глюкозы, денитрификация, отношение к источникам азота, кислороду и т.д.), используя «Определитель бактерий Берджи» и др. [8, 9].

Для уточнения видовой принадлежности выделенных культур провели идентификацию бактерий методом определения нуклеотидной последовательности фрагмента *16S rRNA* гена, с последующим определением идентичности нуклеотидной последовательности с последовательностями, депонированными в международной базе данных Gene Bank. Для выделения хромосомной ДНК использовали метод Kate Wilson [10].

Концентрацию ДНК измеряли с использованием спектрофотометра NanoDrop при длине волны 260 нм. Для амплификации фрагмента *16S rRNA* гена была выполнена реакция ПЦР с универсальными праймерами [11] 8f 5' –

AgAgTTTgATCCTggCTCAg-3 и 806R- 5' ggAC-TACCAgggTATCTAAT. Программа ПЦР амплификации включала длительную денатурацию 95°C в течение 7 минут; 30 циклов: 95°C – 30 секунд, 55°C- 40, 72°C – 1 минута; заключительная элонгация 7 минут при 72°C, ПЦР программа была выполнена с применением амплификатора GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Очистку ПЦР продуктов от несвязавшихся праймеров проводили ферментативным методом используя, Exonuclease I (Fermentas) и щелочную фосфатазу (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas) [12].

Реакцию секвенирования проводили с применением BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Нуклеотидные последовательности *16S rRNA* гена идентифицируемых культур были проанализированы с применением программного обеспечения SeqScape 2.6.0 (Applied Biosystems), что позволило выбрать нуклеотидные последовательности протяженностью 730 п.н., которые были идентифицированы в GeneBank по алгоритму BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Множественное выравнивание последовательностей проводилось в программе ClustalX (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>), филогенетический анализ, расчет генетических дистанций, построение дендрограмм – в программе Mega4.0 в Internet (<http://www.megasoftware.net>).

Результаты и обсуждение

Из накопительной культуры был получен 71 изолят углеводородокисляющих микроорганизмов. Стабильный рост на среде с нефтью в качестве единственного источника углерода и энергии продемонстрировали только 18 культур, обозначенных Д1-Д18. На среде с дизельным топливом росли 12 из 18 отобранных культур, с бензином – 9 культур. 8 культур характеризовались способностью расти на средах с добавлением в качестве источника углерода 3 различных углеводов (бензин, дизельное топливо, нефть), они были взяты для дальнейших исследований (таблица 1).

Таблица 1 – Показатели роста культур микроорганизмов на различных углеводородах

Изолят	Оптическая плотность, %			
	0 сутки	5 сутки		
	Контроль	Бензин	ДТ	Нефть
Д1	100*	112±3,8	155±3,7	371±10,1
Д2	100	110±2,1	508±16,6	1050±11,6
Д3	100	150±2,2	759±10,5	1034±20,5
Д5	100	196±7,7	950±15,1	1733±14,2
Д6	100	193±4,7	769±24,5	1271±17,9
Д7	100	233±9,5	241±9,6	632±9,7
Д10	100	191±7,7	294±5,2	1129±22,9
Д18	100	184±5,3	242±8,9	516±9,3

* За 100% взято начальное значение оптической плотности культур (0,2)

На среде, содержащей сырую нефть в качестве единственного источника углерода и энергии, оптическая плотность некоторых культур выросла более чем в десять раз по сравнению с исходной. Самую высокую скорость роста показала культура Д5, ее оптическая плотность на 5 сутки культивирования превысила исходную в 17 раз. Наименьшей скоростью роста характеризовалась культура Д1, оптическая плотность которой при росте на среде с сырой нефтью увеличилась в 3,7 раза.

Данные культуры являются представителями автохтонной микрофлоры Каспия. Возможно, именно поэтому они демонстрируют такой активный рост на среде, содержащей сырую нефть локального месторождения.

На среде, где единственным источником углерода являлось дизельное топливо, прирост оптической плотности культур варьировал в диапазоне от 55% до 850% по сравнению с первыми сутками культивирования.

На среде, где единственным источником углерода являлся бензин, прирост оптической плотности культур варьировал в диапазоне от 10% до 133% по сравнению с первыми сутками культивирования.

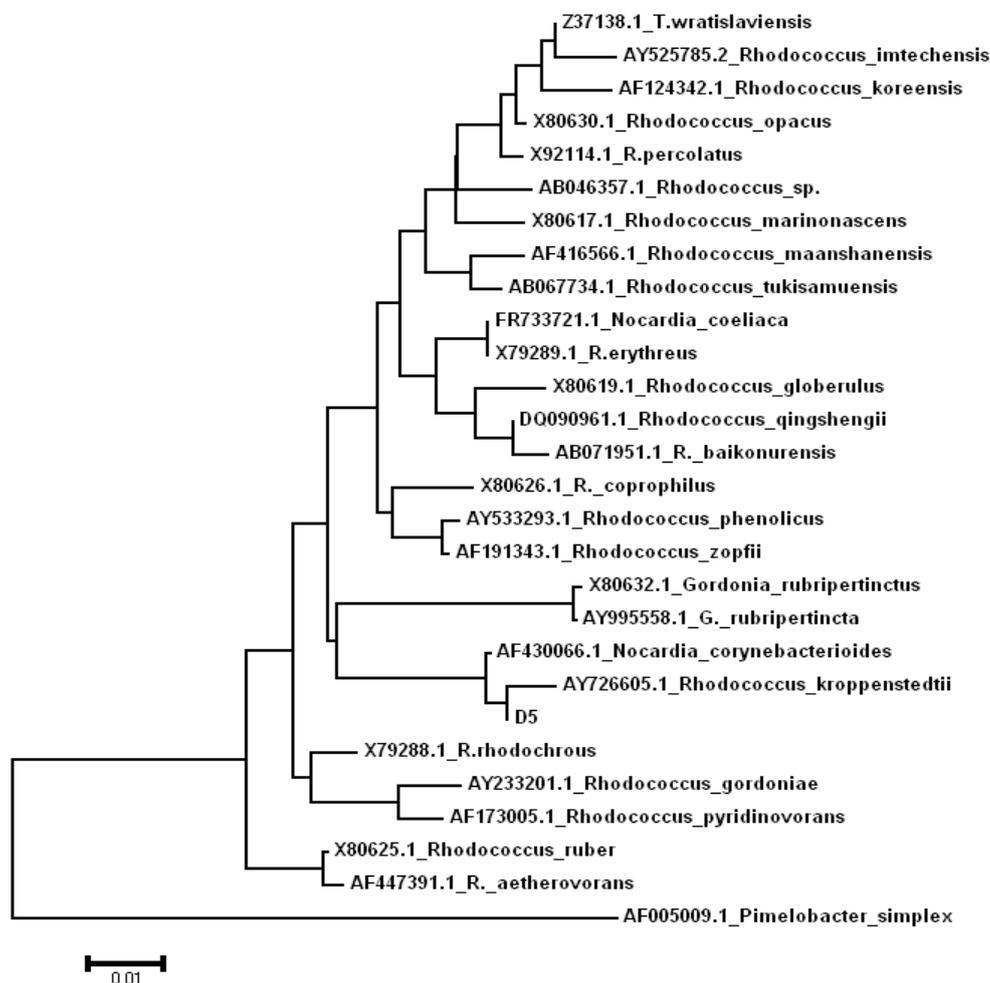
Для уточнения систематики активных углеводородокисляющих культур была произведена их идентификация методом определения нуклеотидной последовательности фрагмента *16S*

rRNA гена, с последующим определением идентичности нуклеотидной последовательности с последовательностями международной базы данных Gene Bank (таблица 2). Дополнительно были построены филогенетические деревья на основе нуклеотидных последовательностей *16S rRNA* гена референтных штаммов данных видов. Также, в анализ были включены нуклеотидные последовательности *16S rRNA* гена наиболее филогенетически связанных микроорганизмов [13], типичный результат проведенного анализа представлен на рисунке.

Идентификация данных культур по стандартным морфологическим, физиолого-биохимическим и молекулярно-генетическим характеристикам показала, что 7 из них относятся к родам *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Ochrobactrum*, *Klebsiella*, *Lysinibacillus* и *Erwinia*. Одна культура была идентифицирована как дрожжи рода *Yarrowia*. Процент идентичности фрагментов нуклеотидных последовательностей *16S rRNA* гена культур Д1, Д5, Д10 и *Pseudomonas pseudoalcaligene*, *Rhodococcus kroppenstedtii* и *Lysinibacillus fusiformis*, соответственно, составил 100%. Культура Д2 была подобна *Klebsiella oxytoca*, Д6 – *Ochrobactrum thiophenivoras*, Д7 – *Bacillus pumilus*, Д18 – *Erwinia sp.*, идентификационные номера которых представлены в таблице 2. Культура Д3 была идентифицирована как подобная дрожжевой культуре *Yarrowia lipolytica*.

Таблица 2 – Результаты идентификации микроорганизмов методом анализа нуклеотидной последовательности гена 16S rRNA

Изолят	Результат идентификации		
	Инвертарный номер Genbank	Штамм	Степень гомологии, %
Д1	JQ670671.1	<i>Pseudomonas pseudoalcaligene</i>	100
Д2	JQ928574.1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99
Д3	HM011048.1	<i>Yarrowia lypolytica</i>	94
Д5	AY726605.1	<i>Rhodococcus kroppenstedtii</i>	100
Д6	FJ005053.1	<i>Ochrobactrum thiophenivoras</i>	100
Д7	JQ904712.1	<i>Bacillus pumilus</i>	99
Д10	JQ844161.1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	100
Д18	EU434702.1	<i>Erwinia sp.</i>	99

**Рисунок 1** – Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа фрагмента гена 16S rRNA группы *Rhodococcus sp.*

Таким образом, из проб воды акватории юго-восточного Каспия выделены и идентифицированы наиболее активные штаммы куль-

тур-нефтедеструкторов, отличающиеся стабильным ростом на среде с добавлением нефти локальных месторождений (и некоторых не-

фтепродуктов) в качестве единственного источника углерода и энергии. Полученные данные способствуют пополнению данных о микробном разнообразии нефтезагрязненных участков

Казахстанской территории шельфа Каспийского моря и будут изучены в качестве нового ресурса для автохромной биоаугментации данной территории.

Литература

- 1 Гаджиев А.А., Шихшабеков М.М., Абдурахманов Г.М., Мунгиев А.А. Анализ экологического состояния Каспия и проблем воспроизводства рыб. – М.: Наука, 2003. – 424 с.
- 2 Куликова И.Ю. Микробиологическая оценка вод Северного Каспия в условиях освоения месторождений углеводородного сырья // Исследовано в России. – 2005. – №118. – С. 1190-1198.
- 3 Zhang D.C., Mörtelmaier C., Margesin R. Characterization of the bacterial archaeal diversity in hydrocarbon-contaminated soil // *Sci Total Environ.* – 2012. – № 1. – P. 184-196.
- 4 Margesin R., Schinner F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2001. – № 56(5-6). – P.650-663.
- 5 Nikolopoulou M., Pasadakis N., Norf H., Kalogerakis N. Enhanced ex situ bioremediation of crude oil contaminated beach sand by supplementation with nutrients and rhamnolipids // *Mar Pollut Bull.* – 2013. – № 77(1-2). – P. 37-44.
- 6 Antić M.P., Jovancićević B.S., Ilić M., Vrvic M.M., Schwarzbauer J. Petroleum pollutant degradation by surface water microorganisms // *Environ Sci Pollut Res Int.* – 2006. – № 13(5). – P. 320-327.
- 7 Das R., Kazy S.K. Microbial diversity, community composition and metabolic potential in hydrocarbon contaminated oily sludge: prospects for in situ bioremediation // *Environ Sci Pollut Res Int.* – 2014. – № 21(12). – P. 7369-7389.
- 8 Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М., Колотилова Н.Н. и др. Практикум по микробиологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
- 9 Knieg N.R., Holf Y.G. Bergry's Manual of Systematic Bacteriology. – London: Williams and Wilkins, 1984. – 154 p.
- 10 Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // *Current Protocols in Molecular Biology.* – 1987. – P. 241-245.
- 11 Werle E., Schneider C., Renner M., Völker M., Fiehn W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – № 22. – P. 4354-4355.
- 12 Clayton R.A., Sutton G., Hinkle P.S., Bult Jr. C., Fields C. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa // *International Journal of Systematic Bacteriology.* – 1995. – № 45. – P. 595-599.
- 13 Pot B., Tsakalidou E. Taxonomy and Metabolism of Lactobacillus. Lactobacillus molecular biology from Genomics to Probiotics. – Norfolk UK: Caister Academic Press, 2009. – 206 p.

References

- 1 Gadzhiev A.A., Shihshabekov M.M., Abdurahmanov G.M., Mungiev A.A. Analiz jekologicheskogo sostojanija Kaspija i problem vosproizvodstva ryb. – M.: Nauka, 2003. – 424 s.
- 2 Kulikova I.Ju. Mikrobiologicheskaja ocenka vod Severnogo Kaspija v uslovijah osvoenija mestorozhdenij uglevododorodnogo syr'ja // *Issledovano v Rossii.* – 2005. – №118. – S. 1190-1198.
- 3 Zhang D.C., Mörtelmaier C., Margesin R. Characterization of the bacterial archaeal diversity in hydrocarbon-contaminated soil // *Sci Total Environ.* – 2012. – № 1. – P. 184-196.
- 4 Margesin R., Schinner F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2001. – № 56(5-6). – P.650-663.
- 5 Nikolopoulou M., Pasadakis N., Norf H., Kalogerakis N. Enhanced ex situ bioremediation of crude oil contaminated beach sand by supplementation with nutrients and rhamnolipids // *Mar Pollut Bull.* – 2013. – № 77(1-2). – P. 37-44.
- 6 Antić M.P., Jovancićević B.S., Ilić M., Vrvic M.M., Schwarzbauer J. Petroleum pollutant degradation by surface water microorganisms // *Environ Sci Pollut Res Int.* – 2006. – № 13(5). – P. 320-327.
- 7 Das R., Kazy S.K. Microbial diversity, community composition and metabolic potential in hydrocarbon contaminated oily sludge: prospects for in situ bioremediation // *Environ Sci Pollut Res Int.* – 2014. – № 21(12). – R. 7369-7389.
- 8 Netrusov A.I., Egorova M.A., Zaharchuk L.M., Kolotilova N.N. i dr. Praktikum po mikrobiologii: uchebnoe posobie dlja studentov vysshih uchebnyh zavedenij. – M.: Akademija, 2005. – 608 s.
- 9 Knieg N.R., Holf Y.G. Bergry's Manual of Systematic Bacteriology. – London: Williams and Wilkins, 1984. – 154 r.
- 10 Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // *Current Protocols in Molecular Biology.* – 1987. – R. 241-245.
- 11 Werle E., Schneider C., Renner M., Völker M., Fiehn W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – № 22. – P. 4354-4355.
- 12 Clayton R.A., Sutton G., Hinkle P.S., Bult Jr. C., Fields C. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa // *International Journal of Systematic Bacteriology.* – 1995. – № 45. – P. 595-599.
- 13 Pot B., Tsakalidou E. Taxonomy and Metabolism of Lactobacillus. Lactobacillus molecular biology from Genomics to Probiotics. – Norfolk UK: Caister Academic Press, 2009. – 206 p.