

8. Zorina A., Stepanchenko N., Novikova G.V., Sinetova M., Panichkin V.B., Moshkov I.E., Zinchenko V.V., Shestakov S.V., Suzuki I., Murata N., Los D.A. Eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases SpkC/F/K are involved in phosphorylation of GroES in the cyanobacterium *Synechocystis* // *DNA Research* – 2011. V. 18. P. 137-151.

9. Los D.A., Zorina A., Sinetova M., Kryazhov S., Mironov K., Zinchenko V.V. (2010) Stress sensors and signal transducers in cyanobacteria. *Sensors* 10: 2386-2415.

**Л.В. Игнатова, Е.В. Бражникова, Т.Д. Мукашева, В.Л. Цзю, Р.Ж. Бержанова,  
Р.К. Сыдыкбекова, С.Е. Шукешева**

## **СКРИНИНГ АКТИВНЫХ НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ СРЕДИ ДРОЖЖЕПОДОБНЫХ ГРИБОВ РОДА *AUREOBASIDIUM***

(Казахский национальный университет имени аль-Фараби)

Одной из серьезных проблем восстановления природной среды при добыче, транспортировке и переработке нефти является ликвидация нефтяного загрязнения и утилизации отходов нефтяной промышленности. Наиболее перспективным направлением биоремедиации нефтезагрязненных объектов является применение биологического метода, основанного на использовании биохимического потенциала микроорганизмов, позволяющих ускорить разложение нефти и нефтепродуктов, не нанося дополнительного ущерба нарушенной экосистеме [1,2].

Микробиологическая активность является важным фактором при утилизации нефтяных загрязнений. Однако высокомолекулярные парафины, ароматические и полициклические соединения, содержащиеся в сырой нефти, прочно связываются с почвенными частицами, образуя гидрофобные пленки, и становятся практически недоступными для ферментных систем микроорганизмов. Одним из важнейших механизмов окисления гидрофобных углеводородов нефти является продуцирование микроорганизмами-нефтедеструкторами биосурфактантов, которые способствуют десорбции и солюбилизации нефтяных углеводородов, тем самым, облегчая их ассимиляцию микробными клетками [3].

Поскольку углеводородоокисляющие микроорганизмы растут на границе раздела фаз «углеводород/вода», синтез эмульгаторов при высокой клеточной плотности увеличивает площадь поверхности углеводородных капель, создавая оптимальные условия питания для большего числа бактерий. В то же время, при использовании такого сложного субстрата, как нефть, по окончании процесса ферментативного окисления ее легкодеградируемых фракций наличие эмульгатора позволяет микроорганизмам, отсоединиться от «использованной» нефтяной капли и переходить к «свежему» субстрату [4].

Поверхностно-активные вещества, продуцируемые дрожжеподобными грибами *Aureobasidium pullulans*, могут являться мощным регулятором активности микробной популяции [5,6]. Одним из важных критериев оценки поверхностно-активных веществ при их практическом использовании является способность к эмульгированию углеводородов.

Цель исследований – оценка эмульгирующей и нефтедеструктирующей активности штаммов дрожжеподобных грибов *Aureobasidium pullulans*.

### **Материалы и методы**

В качестве объектов были выбраны 30 штаммов *Aureobasidium pullulans*, способных к продукции различных биологически активных соединений: экзополисахаридов и меланинов. Эмульгирующую активность определяли спектрофотометрически при выращивании на минеральной среде Чапека-Докса в течение 7 суток. Динамику численности изучали при росте в полупогруженных условиях на минеральной среде 8E.

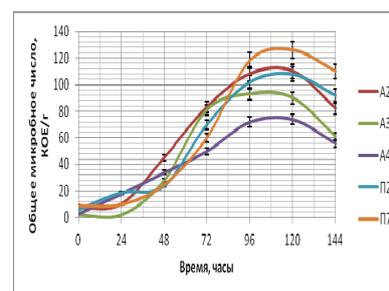
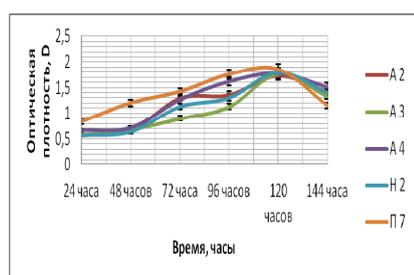
При изучении деструкции нефти оценивали суммарный показатель ее убыли как в жидкой среде, так и в стерильном песке, определяемый весовым методом (гравиметрия). Культуры выращивали на минеральной среде 8E, содержащей 1%, 2% и 3% сырой нефти от общего объема. Первоначальное содержание нефти в песке составило 12 500 мг/кг, что соответствует умеренно-сильному уровню загрязнения, поскольку превышает ориентировочно допустимое количество (ОДК) нефти в почве в 11 раз. Продолжительность опыта - 14 суток. Определение фитотоксичности проводили по стандартной методике с использованием семян редиса.

### **Результаты и обсуждение**

Эмульгирование углеводородов с помощью поверхностно-активных веществ улучшает поступление гидрофобных органических загрязнителей из почвы и воды в микробные клетки и соответственно их деградацию.

Показано, что в процессе роста микроорганизмов возрастает оптическая плотность фильтрата. Степень эмульгирования у всех вариантов разная, но динамика эмульгирования одинаковая: с началом роста идет увеличение эмульгирования и максимального значения оно достигает к 120 часам культивирования (0,8-1,9) (рис. 1, а). В результате было отобрано 5 штаммов-нефтедеструкторов А2, А3, А4, Н2 и П7 с максимальным значением эмульгирующей активности на 5-е сутки опыта (от 1,74 до 1,86 оп. ед.), из которых наибольшей эмульгирующей способностью обладает культура П7 (1,86).

На следующем этапе проведено изучение динамики численности наиболее активных штаммов А2, А3, А4, Н2 и П7. В результате было показано, что в течение первых суток происходит активное размножение клеток у всех культур (рис.1, б), что сопровождается резким повышением эмульгирующей активности, особенно у штаммов П7, А1 и А3. Вероятно, это связано с началом экскреции экзометаболитов, в частности биоэмульгаторов. Максимум значений эмульгирующей активности, а также численности культур приходится на 5-е сутки, что связано с высоким уровнем продукции внеклеточных полисахаридов.



А Ось абсцисс – время (часы); ось ординат – оптическая плотность (D); Ось абсцисс – время (часы); ось ординат – общее микробное число (КОЕ/г)

Рисунок 1. Динамика эмульгирующей активности (А) и численности микроорганизмов (Б) на минеральной среде 8Е

Исследованные штаммы различались по степени деструкции нефти. Как видно из результатов таблицы 1, 2% концентрация нефти в среде является оптимальной для роста всех штаммов, о чем свидетельствуют высокие показатели деструктивной активности. Низкие показатели на среде с 1% нефти, скорее всего, связаны с недостатком субстрата как для ростовых процессов, так и для синтеза поверхностно-активных соединений. Увеличение концентрации нефти до 3%, чревато увеличением концентрации токсичных компонентов нефти, обладающих биоцидным и мутагенным воздействием.

Наиболее активными оказались культуры А4, Н2 и П7, способные к утилизации нефти более чем на 40% (таблица 1).

Таблица 1. Деструкция нефти дрожжеподобными грибами в жидкой среде

№	Варианты опыта	Исходное содержание нефти в среде, мг/л	Содержание остаточной нефти, мг/л	Разница с контролем, %
1	2	3	4	5
1	Контроль (1% нефти)	8 760,23 ± 350,41	8 667,72 ± 346,71	0,0 ± 0,00
2	А2 1%	8 760,23 ± 350,41	4 859,02 ± 194,36	43,94 ± 1,76
3	А4 1%	8 760,23 ± 350,41	4 457,21 ± 178,29	48,61 ± 1,94
4	Н2 1%	8 760,23 ± 350,41	4 960,33 ± 198,41	42,82 ± 1,71
5	П7 1%	8 760,23 ± 350,41	7 445,82 ± 297,83	14,11 ± 0,56
6	А3 1%	8 760,23 ± 350,41	5 069,71 ± 202,79	41,53 ± 1,66
7	Контроль (2% нефти)	14 568,61 ± 582,74	14 448,93 ± 577,96	0,0 ± 0,00
8	А2 2%	14 568,61 ± 582,74	3 287,32 ± 131,49	77,25 ± 3,09
9	А4 2%	14 568,61 ± 582,74	3 159,61 ± 126,38	78,11 ± 3,13
10	Н2 2%	14 568,61 ± 582,74	2 632,43 ± 105,30	81,82 ± 3,27
11	П7 2%	14 568,61 ± 582,74	1 867,72 ± 74,71	87,07 ± 3,48
12	А3 2%	14 568,61 ± 582,74	3 737,21 ± 149,49	74,12 ± 2,97
13	Контроль (3% нефти)	20 621,14 ± 824,84	19 931,54 ± 797,26	0,0 ± 0,00
14	А2 3%	20 621,14 ± 824,84	14 502,31 ± 580,09	27,24 ± 1,09

15	A4 3%	20 621,14 ± 824,84	11 454,02 ± 458,16	42,54 ± 1,70
16	H2 3%	20 621,14 ± 824,84	13 773,23 ± 550,93	30,93 ± 1,24
17	П7 3%	20 621,14 ± 824,84	8 872,04 ± 354,88	55,52 ± 2,22
18	A3 3%	20 621,14 ± 824,84	12 606,52 ± 504,26	36,83 ± 1,47

При изучении процесса биодеструкции нефти наиболее активными культурами *Aureobasidium pullulans* в модельных экспериментах в задачу исследований входила очистка нефтезагрязненного стерильного песка с использованием дрожжеподобных грибов в комплексе с древесными опилками. Как видно из результатов таблицы 2, на 14-е сутки при интродуцировании клеток штаммов *A. pullulans* П7 и А4 остаточное количество нефти в почве было самым низким и составило 1,73 г/кг у штамма А4 и 1,03 г/кг у штамма П7. Таким образом, было установлено, что исследуемые штаммы по способности разлагать сырую нефть располагаются в следующей последовательности:

П7 (1,03 г/л) > А4 (1,73 г/л) > Н2 (2,35 г/л) > А2 (2,74 г/л) > А3 (4,12 г/л)

Параллельно было проведено определение фитотоксичности почв с использованием семян редиса. Данный тест широко используется в различных экспериментах, благодаря тому, что является весьма удобным и показательным. Фитотоксичность обработанного песка была различна и зависела от интродуцируемых культур. Максимальная токсичность отмечена в контрольном варианте, о чем свидетельствует процент проросших семян редиса (8,4%), минимальная – после внесения культур Н2 (82,2%) и П7 (85,8%); в остальных вариантах этот показатель варьировал от 38,2% до 78,4%.

Таблица 2. Деструкция нефти дрожжеподобными грибами в модельных экспериментах

№	Вариант	Содержание остаточной нефти, г/кг		Разница контролем, %	Кол-во проросших семян, %
		На 7-е сутки	На 14-е сутки		
1	Контроль	7,68 ± 0,30	7,24 ± 0,29	0,0	8,43
2	А2	3,33 ± 0,13	2,74 ± 0,11	56,64 ± 2,26	38,21
3	А3	4,78 ± 0,19	4,12 ± 0,16	73,03 ± 2,92	66,32
4	А4	2,54 ± 0,12	1,73 ± 0,06	91,12 ± 3,64	78,43
5	Н2	3,21 ± 0,12	2,35 ± 0,09	96,31 ± 3,85	82,22
6	П7	1,32 ± 0,05	1,03 ± 0,04	86,58 ± 3,46	85,81

### Заключение

В результате исследований были отобраны 5 штаммов-нефтедеструкторов с максимальным значением эмульгирующей активности (А2, А3, А4, Н2 и П7), из которых наибольшей эмульгирующей способностью обладала культура П7. Установлена зависимость между численностью исследуемых штаммов и их эмульгирующей активностью. Показано, что максимальных значений эти величины достигают на 5-е сутки культивирования. Было установлено, что исследуемые штаммы по способности разлагать сырую нефть располагаются в следующей последовательности: П7 > А4 > Н2 > А2 > А3

1. Киреева Н.А. Микробиологические процессы в нефтезагрязненных почвах. - Уфа: БашГУ, 1994.-172 с.
2. Молотков И.В., Касьяненко В.А. Рекультивация нефтезагрязненных почв // НефтьГазПромышленность. - 2005. - С.307-311.
3. Herbes S.E., Schwall L. R. Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in pristine and petroleum contaminated sediments. - Appl. Envir. Microbiol. – 1978. - V. 3. - С. 306.
4. Коронелли Т. В. Поступление углеводов в клетки микроорганизмов //Усп. Микробиологии. - 1980. - Вып. 15. - С. 99
5. Crescenzi V. Microbial Polysaccharides of Applied Interest: Ongoing Research Activities in Europe // Biotechnol. Prog. - 1995. - №3. - P.251-259.
6. Reeslev M., Jorgensen B. Exopolysaccharide production and morphology of *Aureobasidium pullulans* grown in continuons cultivation with warying cemmonium glucose ratio in the growth medium // J. Biotechnol.- 1996.- №2.-С.131-135.

\*\*\*

Microbiological activity is an important factor at utilization of oil pollution. The surface-active substances produced by *Aureobasidium pullulans*, can be a powerful regulator of activity of microbic population. As a result of researches emulsifying and oil destruction activity of strains *Aureobasidium pullulans* was estimated