

УДК 606:57.063.8:575:57.082.13

**Мобайен Х.¹, Садигдбайан Х.², Насери А.³, Дехнад А.¹,
Модир-Шахла Н.¹, Ахмадпор Ф.¹**

¹Исламский свободный университет (г. Тебриз, Исламская республика Иран)

²Институт микробиологии НАН Азербайджана (г. Баку)

³Тебризский университет (Исламская республика Иран)

ВЫДЕЛЕНИЕ КУЛЬТУРЫ (*ACHROMOBACTER SP.*) ДЕГРАДАТОРА ПАРАФИНА ИЗ ПОЧВЫ

Аннотация. Из аридных почв (Азершехр, Восточный Азербайджан, Иран) были изолированы и получены 10 чистых культур микроорганизмов. Из всех выделенных культур только штаммы F10 и E12, идентифицированные с помощью молекулярных тестов и полимеразной цепной реакции (PCR, ПЦР) как *Achromobacter sp.*, были способны разлагать жидкий парафин более чем на 90%. Основной промежуточный продукт разложения парафина был идентифицирован как уксусная кислота. Анализ микрофлоры различных почв показал возможность получения штаммов бактерий, которые в свою очередь могут быть использованы для получения с помощью методов генетической модификации микробных препаратов – перспективных для деградации органических соединений (подобно парафинам).

Ключевые слова: жидкие парафины, штаммы *Achromobacter sp.*, полимеразная цепная реакция (PCR).

**H. Mobaiyen¹, K. Sadighbayan², A.-H. Naseri³, A. Dehnad¹,
N. ModirShahla¹, F. Ahmadpor¹**

¹Islamic Azad University, Tabriz, Islamic Republic of Iran

²Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Azerbaijan, Baku

³University of Tabriz, Islamic Republic of Iran

ISOLATION OF PARAFFIN-DEGRADER *ACHROMOBACTER SP.* FROM AZARSHAR SOILS (EAST AZARBAYJAN, IRAN)

Abstract. Ten pure colonies of microorganisms were isolated and purified from arid soils of Azarshahr (East Azerbaijan, Iran). Of all the isolates, and only strains F10 and E12, identified by molecular tests and polymerase chain reaction (PCR) as *Achromobacter sp.*, could degrade liquid paraffin by more than 90%. The primary intermediate product of decomposed paraffin was identified as acetic acid. Analysis of various soil microflora showed the possibility of obtaining strains of bacteria, which in turn can be used to produce microbial preparations, promising for the degradation of organic compounds (like paraffin), by the methods of genetic modification.

Key words: biodegradation, Liquid paraffin, *Achromobacter*, polymerase chain reaction.

Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами превышает 10 млн.т в год [10]. Парафиновые соединения являются одними из компонентов сырой нефти. Они находятся в различной форме и соединениях в асфальтенах и алифатических углеводородах, создавая парафиновые комплексы. Парафинсодержащие соединения легко вытекают при высокой температуре из нефтяных скважин, трубопроводов, при авариях нефтетанкеров. Парафиновые вещества отлагаются при температуре около 30°C внутри скважин и нефтепроводов и также относятся к загрязнителям

окружающей среды. Как правило, методы контроля за парафиновыми отложениями дороги и трудны [2], в этой связи рекомендуются биологический контроль [5]. Доказано, что микробиологическая обработка, основанная на использовании природных или специально выделенных бактерий, является альтернативными путями для предотвращения их отложений и удаления [11]. В этой связи целью наших исследований является изолирование парафиндеградирующих микроорганизмов из различных почв из провинции Восточного Азербайджана (Иран).

Материалы и методы

Отбор проб почв. Образцы почв отбирали из различных точек территории округа Азершехр (Восточный Азербайджан) (табл. 1). Отбор производили с горизонтов 0-30 см по 400 г почв, образцы помещали в пластиковые пакетики [1] и направляли в лабораторию для исследований.

Выделение штаммов микроорганизмов. С каждого образца почв готовили разведения 10^{-1} - 10^{-6} . Затем с каждого разведения отбирали 100 μ л и переносили в чашку Петри с крахмалказеиновым агаром. Инкубирование проводили в течение недели при температуре 28°C. Выросшие колонии переносили на среду глюкозо-солодового агара для очистки и получения изолированных колоний [3]. Очищенные штаммы содержали в холодильнике при температуре -70°C.

Оценка деградации жидкого парафина изолированными штаммами микроорганизмов. Каждый выделенный штамм инокулировался в

триптиказном соевом бульоне и инкубировался при 28°C до достижения мутности среды, равной 0,5 стандарта McFarland. Затем 0,5 мл среды, содержащей бактерии, помещали в трубки Falcon, которая содержала 25 мл агар Muller Hinton и 1 мл жидкого парафина. Трубки инкубировали на качалке при встряхивании 120 об/мин при температуре 28°C в течение недели [7; 12].

Метод извлечения парафина из среды. С целью максимального выделения парафина из среды изучены различные растворители – бензол, хлороформ, дихлорметан, гексан, толуол. Для этого готовили растворы жидкого парафина с концентрацией 0,125-1,0% в указанных растворителях. Определяли спектральное поглощение каждого раствора в диапазоне 200-500 nm в двухлучевом спектрофотометре Shimadzu UV 1700. Максимальный пик поглощения исследуемых растворов парафина в растворителях принимался как λ_{\max} , которая была использована

для оценки поглощения исследуемых образцов [7]. Экстракцию из трубок Фалконе остаточного парафина проводили 5 мл гексана [3].

Определение степени деградации парафина выделенными культурами микроорганизмов. Степень деградации парафина определяли по формуле:

$$\frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100,$$

где: A_1 – абсорбция парафина до деградации микроорганизмами, A_2 – абсорбция парафина в конце опыта [7].

Определение продуктов метаболизма парафинов микроорганизмами. Продукты метаболизма парафинов определяли с использованием газового хроматографа Shimadzu GC 2010. Использовали колонку CPED1-M25-025; длина колонки 24,9 м; максимальная температура была 325°C (начальная температура была 80°C), условия определения были следующие: время удержания – 1 мин; скорость – 8°C.

Метод экстракции ДНК из клеток микроорганизмов. Культуры культивировали на среде SCA при температуре 28°C в течение 3-7 дней. Затем бактериальная масса каждой из культур переносилась в микро튜브ку объемом 1,5 мл, содержащей 500 µl лизисного буфера. Затем микро튜브ка помещалась в жидкий азот, а затем в инкубатор при температуре 65°C, этот процесс повторялся семь раз. Затем трубка центрифугировалась в течение 10 минут при скорости 1300 об/мин. Жидкую фазу супернатанта смешивали с хлороформ-изоамиловым спиртом в соотношении 1:24 и затем центрифугировали в течение 10 минут при скорости 1300 об/мин. Затем

в среду вносили холодный изопропанол, выдерживали при температуре -20°C в течение 2 часов и вновь повторяли центрифугирование. После отделения супернатантной жидкости микро튜브ка промывалась раствором 70%-го спирта. После выпаривания остаточного спирта из микро튜브ки экстрагированная ДНК смешивалась с 100 µl дистиллированной водой и сохранялась при температуре -20°C. Все материалы и среды были получены из корпорации Sinagen co. (Иран).

Для амплификации 16Sr РНК использовали универсальные праймеры из банка генов NCBI :

Pf 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3'
PR 5'- AAGGAGGGTGATCCAGCCGC-3'

Использовалось программное обеспечение OLIGO.

Амплификацию проводили с использованием 10 мкл буфера сульфатом магния, 3 мкл ДНТФ (2,5 ммоль), 1,5 мкл прямого и обратного праймеров, 2 мкл ДНК-матрицы, 0,5 мкл Taq ДНК-полимеразы, 10 мкл ДНК-полимеразу Pfu (1ед/µl) и 22,5 мкл стерильной дистиллированной воды. Конечный объем составил 50 мкл. Температурно-временной профиль ПЦР был следующим: первый цикл – 96°C x 6 мин., 55°C x 1 мин., 72°C x 2 мин., количество циклов -30. Все эти процессы были проведены в термоциклере (BIO RAD США). Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 1,5% в агарозном геле и документировали с помощью системы BioDoc Analyze («Biometra», Германия), Выделение и очистку фрагментов проводили из легкоплавкой агарозы с использованием прибора Wizard PCR Preps фирмы «Promage» согласно рекомендациям производителя. Секвени-

рование очищенных ПЦР-фрагментов проводили с использованием набора BigDye Trmination и 3.1 Cycle Sequencing Kit. Нуклеотидные последователь-

ности определяли на автоматическом секвенаторе DNA Analyzer 3730. Для секвенирования использовали те же праймеры, что и для проведения ПЦР.

Результаты

Из аридных почв Азаршахра были изолированы и получены 10 чистых культур. Степень деградации, оптическая плотность в первом и повторном опытах и места выделения культур показаны в табл.1. Оптические плотности исходных растворов парафинов до экспериментов составляли соответственно 1,123 и 1,377. Только два

штамма из десяти выделенных были способны полностью разлагать парафины (табл.1). В табл. 2 показаны основные промежуточные продукты деградации. Из двух исследованных штаммов только штамм F10 образовывал 1500 нуклеотидных связей, что позволило его идентифицировать как *Achromobacter sp.*

Результаты и обсуждение

Использование микроорганизмов в качестве инокулятов является одним из основных положительных факторов для очистки нефтезагрязненных почв, так как они: 1) способны разлагать

углеводороды, 2) отличаются устойчивостью и адаптированы к окружающей среде, 3) способны конкурировать с эндогенными микроорганизмами, 4) большинство из них не патогенны. В

Таблица 1

Степень биodeградации парафина (в %) микроорганизмами, выделенными из различных зон

Культуры микроорганизмов	Первый тест	
	ОП	% биodeградации
A4	1.005	39,16
M53	0.89	46,12
M51	0.834	49,51
A2	0.551	66,64
F24	0.652	60,53
F10	0.153	90,73
M67	0.76	53,99
E12	0.118	92,85
E20	1.065	35,53
M11	0.928	43,81

Прим.: ОП - оптическая плотность остаточного парафина после деградации микроорганизмами.

Таблица 2

Вероятные продукты метаболизма парафинов выделенными микроорганизмами

Наиболее вероятный продукт разложения	Время жизни промежуточных продуктов, полученных из колонки, мин.	Культуры микроорганизмов
Уксусная к-та, бутиловый эфир	4.93	F10
циклогептасилоксан, тетрадекаметил-	23.67	
6-аза-5,7,12,14-тетрагипентацен	27.66	
циклогептасилоксан, додекаметил	31.09	
циклогептасилоксан, тетрадекаметил-	20.71	E12
циклогептасилоксан, тетрадекаметил-	23.68	
дибутанолморфин	27.11	
6-аза-5,7,12,14-тетрагипентацен	27.66	

этом направлении проведены многочисленные исследования, в основе которых – выделение из природных сред и исследование микроорганизмов. Например, Каплан и др. выделили и изучили штаммы родов *Flavobacterium* и *Pseudomonas*, способных разлагать нефтяные углеводороды [8].

В работе Гуо и др. показано, что культура *Pseudomonas aeruginosa* разлагала сырую нефть более чем на 58% с образованием биомассы микроорганизмов и рамнолипидов [6]. Исследованиями показано, что культура *Vaccillus amyloliquefaciens* разлагала около 98,2% парафиновых соединений [9]. Хором и др. показали, что гетеротрофная углеводородокисляющая бактерия способна разлагать 45-60% нормальных парафинов [4]. Исследования показали, что только культура, относящаяся к роду *Achromobacter* sp. была способна деградировать 86% жидкого парафина, одним из промежуточных продуктов разложения была уксусная

кислота. Полученные данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего исследования парафинокисляющих микроорганизмов с целью создания их консорциумов с перспективой использования для внесения в загрязненные почвы с целью очистки их от загрязнений.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Alexander M. Introduction to soil microbiology. – NY and L.: John Wiley and Sons, Inc., 1998. – 233 p.
2. Banwar L.A.L. Prevention of paraffin deposition in oil well Thermophilic paraffin degrading strain *Geobacillus kaustophilus* / Banwar L.A.L. et al. –New Delhi, India: Petrotech. – 2009. – 224 p.
3. Bardi L. Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with β -cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability / Bardi L. et al. // J. Enzyme and Microbial Technology. – 2000. – V. 27 (Iss. 9). – P. 709–713.
4. Chorom M. Bioremediation of a crude oil-Polluted soil by application of fertilizers / Chorom M. et al. // Iran.-J. Environ.

- Health. Sci. Eng. – 2010. – V. 7 (№4). – P. 324–326.
5. Garcia-Rivero M. Organic solvents improve hydrocarbon desorption and biodegradation in highly contaminated weathered soils / Garcia-Rivero M. et al. // Environ. Eng. Sci. – 2007. – № 6. – P. 389–395.
 6. Guo Y. A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematic / Y. Guo et al. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2008. – V. 58. – P. 149–159.
 7. Jussara P., Francisca P. Biodegradation of crude oil in sandy sediment // Jour. International Biodeterioration & Biodegradation. – 1999. – V. 44. – P. 87–92.
 8. Kaplan C.W., Kitts C.L. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit // Applied an Environmental Microbiology. – 2004. – V. 70 (№3). –P. 1777–1786.
 9. Naggar A.Y. Bioremediation of Paraffinic and Poly nuclear aromatic hydrocarbons Using Laser irradiated *Bacillus amyloliquefaciens* / Naggar A.Y. et al. // Journal of American Science. – 2010. – V.6 (№10). – P. 661–670.
 10. Olivieri R. Microbial degradation of oil spills enhanced by a slow release fertilizer / Olivieri R. et al. // Applied and Environmental Microbiology. – 1976. – V. 31 (5). – P. 629–634.
 11. Sadeghzad A., Ghaemi N. Microbial prevention of wax precipitation in crude oil by biodegradation mechanism // SPE Asia Pacific Oil and Gas Conference and Exhibition (Paper SPE 80529). – Jakarta, Indonesia: Society of Petroleum Engineers, 2003. – P. 1–11.
 12. Southam G. Structural characterization of the hydrocarbon degrading bacteria-oil interface: implications for bioremediation // Jour. International Biodeterioration & Biodegradation. – 2001. – V. 47 (Iss. 4). – P. 197–201.