
AUXILIARY DISCIPLINES

DOI: <https://doi.org/10.23649/jae.2022.5.25.06>

Sharapova I.E. *

Institute of Agrobiotechnologies named after A.V. Zhuravsky of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia

* Corresponding author (i_scharapova[at]mail.ru)

Received: 04.09.2022; Accepted: 12.09.2022; Published: 19.09.2022

CULTIVATION OF MICROORGANISMS ON COMBINED ENVIRONMENT FOR THE PRODUCTION OF OIL-DEGRADING BIOLOGICAL PRODUCTS

Research article

Abstract

Petroleum hydrocarbons (PH) can lead to significant negative changes in agrobiocenoses. A method that has proven its effectiveness, economic feasibility, environmental safety and does not entail secondary pollution is bioremediation, which uses biological products based on hydrocarbon-oxidizing microorganisms. For the purposes of obtaining oil-degrading biological products, the productivity of bacterial strains (*Rhodococcus*), yeast (*Rhodotorula*) and mycelial (*Trichoderma*) fungi during liquid-phase cultivation was analyzed. It is proposed to obtain suspensions of monocultures of bacteria, yeast and fungi based on combined nutrient environment. Bacteria were grown on the environment of Чапек, Раймонд, НУОМ, yeast and mycelial fungus – on the media of Чапек, Райдер, Кноп. Diesel fuel (DF) or 0,5% oil as co-substrates and inducers of biochemical activity were used for cultivation in the nutrient environment. The best parameters of biomass productivity were marked in combined nutrient environment with the addition of DF: for *R. equi* bacteria – Чапек environment, for *R. glutinis* yeast culture – НУОМ environment, for *T. lignorum micromycete* – Кноп environment.

Keywords: cultivation, nutrient environment, bacteria, yeast, micromycete, oil degraders, productivity.

Шарапова И.Э. *

Институт агробиотехнологий им. А.В. Журавского Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

* Корреспондирующий автор (i_scharapova[at]mail.ru)

Получена: 04.09.2022; Доработана: 12.09.2022; Опубликовано: 19.09.2022

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НА КОМБИНИРОВАННЫХ СРЕДАХ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НЕФТЕДЕСТРУКТИВНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ

Научная статья

Аннотация

Нефтяные углеводороды (НУВ) могут приводить к значительным негативным изменениям в агробиоценозах. Способом, который доказал свою эффективность, экономическую целесообразность, экологическую безопасность и не влечет за собой вторичного загрязнения, является биоремедиация с использованием биопрепаратов на основе углеводородокисляющих микроорганизмов. Для целей получения активных нефтедеструктивных биопрепаратов проведен анализ продуктивности штаммов бактерий (*Rhodococcus*), дрожжевого (*Rhodotorula*) и мицелиального (*Trichoderma*) грибов при жидкофазном культивировании. Предложено получать суспензии монокультур бактерий, дрожжей и грибов на комбинированных питательных средах. Выращивали бактерии на средах Чапека, Раймонда, НУОМ, дрожжи и мицелиальный гриб – на средах Чапека, Райдер, Кнопа. Для культивирования в составе питательной среды использованы дизельное топливо (ДТ) или нефть 0,5% в качестве ко-субстратов и индукторов биохимической активности. Наилучшими показателями продуктивности биомассы отмечены комбинированные питательные среды с добавлением ДТ: для бактерий *R. equi* – среда Чапека, для дрожжевой культуры *R. glutinis* – среда НУОМ, для микромицета *T. lignorum* – среда Кнопа.

Ключевые слова: культивирование, питательная среда, бактерии, дрожжи, микромицет, нефтедеструкторы, продуктивность.

1. Введение

В настоящее время основная производственная задача сельскохозяйственной агробиотехнологии – снижение потерь урожая, вызванных воздействием различных вредителей и ксенобиотиков. Так, потенциальные потери урожая от

вредных организмов в мире составляют около 48%. [1]. Возможное загрязнение различными ксенобиотиками (тяжелыми металлами, ПАУ, углеводородами и др.) в сельскохозяйственном земледелии не только может снизить плодородие почв, но и опасно для растений и животных, а также может причинить вред здоровью человека [2], [3]. Все эти органические соединения являются опасными и труднорастворимыми загрязнителями. Из-за их относительно высокой растворимости они подвижны с потоком грунтовых вод и образуют шлейфы загрязнения в водоносных горизонтах. Вследствие неизбежного выброса ксенобиотиков в окружающую среду, они встречаются практически повсюду, но около 90% экологической нагрузки и вреда приходится на почвы [4]. Предотвращение этого вреда – один из значительных резервов повышения урожайности и увеличения производства экологически-безопасных продуктов сельского хозяйства. Разработка и внедрение систем рационального применения средств биологической защиты сельскохозяйственных растений в сочетании с микробиологическими средствами реабилитации и детоксикации почв от загрязнений ксенобиотиками должны способствовать долговременной оптимизации фитосанитарной обстановки в агроценозах и улучшению агроэкологического состояния почв. До последнего времени микробиологические препараты не играли существенной роли в повышении эффективности земледелия, в первую очередь из-за сложности и несовершенства способов их получения. Однако необходимость изучения факторов, способствующих эффективному восстановлению биоремедиации земель сельхозназначения, а также факторов, обеспечивающих оптимизацию способов получения биопрепаратов направленного действия, позволит повысить эффективность их применения. Нефтяные углеводороды (НУВ) при попадании в окружающую среду могут приводить к значительным негативным изменениям в агробиоценозах [5]. Наибольшей токсичностью обладают нефть, а также нефтепродукты, которые содержат растворимые в воде ароматические углеводороды [6]. Методом, который обладает эффективностью, экономичностью и экологической безопасностью, является биоремедиация с применением биопрепаратов на основе углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) [7], [8], [9]. Для нефтеокисляющего биопрепарата, обладающего высокой скоростью деградации НУВ, необходимо получить накопительные культуры штаммов микроорганизмов в активной фазе роста. Также необходимо исследовать факторы, влияющие не только на нефтеокисляющую активность, но и на продуктивность культуры – накопление биомассы. Следовательно, исследование приемов культивирования микроорганизмов для получения биопрепаратов направленного действия является наиболее актуальным. Так, установлено, что состав питательной среды при жидкофазном культивировании имеет важное значение для сохранения биологической активности, а также влияет на повышение продуктивности энтомопатогенного гриба – основы биопестицидного препарата [10]. Для получения биомассы накопительной нефтеокисляющей монокультуры в активной фазе роста необходимо подобрать адаптированную комбинированную питательную среду для глубинного культивирования. Необходимость культивирования на комбинированных сложного состава питательных средах обоснована возможностью потери биологической активности микроорганизмами-нефтедеструкторами при многократном пассировании. При пересеве подобных культур на среды, не содержащие углеводороды (например, на богатые углеводами), часто происходит снижение или потеря нефтеокисляющей активности в результате утраты плазмид деградации, а также возможно снижение концентрации легкодоступного субстрата и накопление продуктов окисления [11]. В связи с этим увеличивается вероятность получения накопительных культур, способных расти не на углеводородах, а на продуктах их промежуточного окисления, что, в свою очередь, ведет к потере микроорганизмами нефтеокисляющей активности в отличие от получения накопительной монокультуры УОМ при культивировании на адаптированной комбинированной питательной среде. Также известно, что наиболее перспективными для использования в качестве биопрепаратов являются микроорганизмы, способные к активной биодеградации органических соединений и загрязнителей [7], [12]. Обоснованием выбора монокультур таксономически различных групп микроорганизмов для создания на их основе биопрепаратов послужили данные о том, что бактерии, дрожжевые и мицелиальные грибы отличаются различными метаболическими путями окисления n-алканов, что многие виды мицелиальных грибов рода *Trichoderma* способны окислять ПАУ, а также данные об окислительной активности бактерий рода *Rhodococcus* и дрожжей рода *Rhodotorula*. Поэтому на этапе культивирования для получения биопрепарата на основе монокультуры помимо использования отселектированных нефтеокисляющих штаммов необходима углеводно-углеводородного состава питательная среда, сбалансированная содержанием всех компонентов.

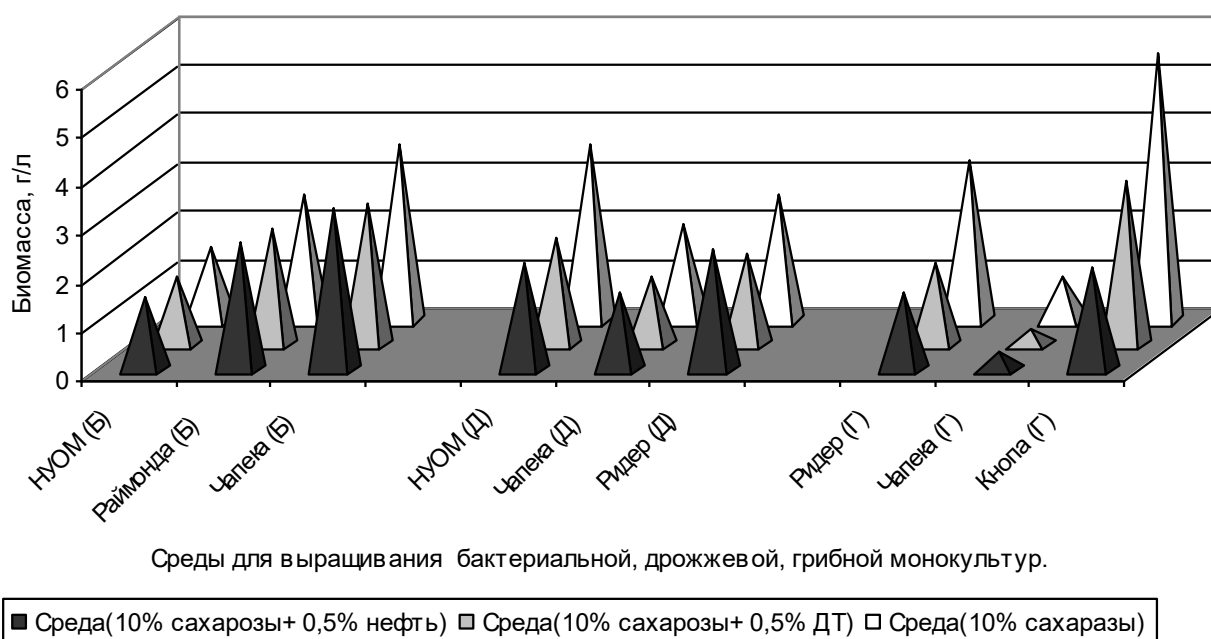
Цель работы – подобрать адаптированную комбинированную питательную среду для жидкофазного культивирования трех таксономически различных штаммов микроорганизмов-нефтедеструкторов.

2. Материалы и методы

Объектами исследований были депонированные штаммы микроорганизмов: бактерии *Rhodococcus equi* (B-1117); дрожжевые грибы *Rhodotorula glutinis* (Y-1112); мицелиальные грибы *Trichoderma lignorum* (синоним *T. viride*, ВКПМ F98). Культивирование бактериальной, дрожжевой и грибной монокультур проводили на различных комбинированных средах с 10% сахарозой, с добавлением в качестве ко-субстратов 0,5% сырой товарной нефти или ДТ. Штаммы выращивали в течение 2,5 суток (180 оборотов/минуту; $T=25\pm 2$ °C). Выращивали бактерии (Б) – на средах Чапека, Раймонда, НУОМ (для нефтеокисляющих микроорганизмов); дрожжи (Д) и мицелиальный гриб (Г) – на средах Чапека, Ридер, Кнопа. Состав среды Ридер, г/л: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,7; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 0,04; NaCl – 0,5; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 0,1. Состав среды НУОМ г/л: NaH_2PO_4 – 10; K_2HPO_4 – 10; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,7; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,013; ZnSO_4 – 0,012; $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,012. Состав среды Кнопа г/л: $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 1,0; K_2HPO_4 – 0,25; KCl – 0,12. Начальный pH 6,8±0,2. Использовали три на различные питательные среды в трехкратной повторности. В каждую колбу со средой внесен инокулят (1 мл на 100 мл среды). Инокуляты предварительно получены на стандартных средах Раймонда и Чапека. Микробиологический контроль: определение прироста биомассы и количества жизнеспособных клеток [13].

3. Результаты и обсуждение

Известно, что биодegradация усиливается, когда количество микроорганизмов увеличивается, и чем больше биоразложение, тем больше прирост биомассы [14]. Уменьшение концентрации субстрата сначала становится заметным, когда присутствует достаточное количество микробов, и процесс останавливается, когда весь субстрат израсходован. Культивирование бактериального, дрожжевого и грибного штаммов на различных питательных средах позволило подобрать адаптированную комбинированную питательную среду. Результаты исследования представлены на рис. 1. Как видно из вышеприведенных данных, при культивировании микробных штаммов до высокой плотности необходимым условием было совмещение обеспечения клеток кислородом и оптимальной комбинированной питательной средой с учетом необходимости получения биомассы на ранней стационарной фазе роста. Отмечены высокие показатели прироста биомассы в вариантах с углеводным составом среды (сахароза). Однако целям работы отвечают варианты с комбинированными питательными средами с содержанием всех компонентов определенного и воспроизводимого состава, включающего ко-субстраты (нефть или ДТ). Сырая товарная нефть в отличие от ДТ имеет более сложный и нестабильный состав, который может отличаться концентрацией компонентов. Поэтому по продуктивности микробов отмечены варианты с комбинированными средами углеродно-углеводного состава на основе сахарозы и ДТ.



Среды для выращивания бактериальной, дрожжевой, грибной монокультур.

■ Среда(10% сахарозы+ 0,5% нефть) □ Среда(10% сахарозы+ 0,5% ДТ) □ Среда(10% сахаразы)

Рис. 1 – Показатели прироста биомассы при культивировании на различных питательных средах монокультур микроорганизмов:

Б – бактерии *R. eqvi*, Д – дрожжи *R. glutinis*, Г – микромицет *T. lignorum*)

4. Заключение

Для получения в активной фазе роста накопительных культур бактерий и грибов исследовали культивирование на различных комбинированных питательных средах. Наилучшими показателями продуктивности биомассы отмечены комбинированные питательные среды с добавлением 0,5% ДТ: для бактериального штамма *R. eqvi* – среда Чапека (из сред Чапека, Раймонда, НУОМ), для дрожжевой культуры *R. glutinis* – среда НУОМ (из сред Чапека, Ридер, НУОМ), для мицелиального гриба *T. lignorum* – среда Кнопта (из сред Ридер, Чапека, Кнопта).

Funding

Presented study was carried out in accordance with the State assignment FUUU-2022-0052.

Финансирование

Работа выполнена в рамках Государственного задания FUUU-2022-0052.

Conflict of Interest

None declared.

Конфликт интересов

Не указан.

References

1. Maxmen A. Crop pests: under attack / A. Maxmen // Nature. – 2013 – 501 – pp.15-17. – URL: <https://www.nature.com/articles/501S15a> (accessed: 13.09.2022)
2. Gikas P. Single and combined effects of nickel (Ni(II)) and cobalt (Co(II)) ions on activated sludge and on other aerobic microorganisms: a review / P. Gikas // J Hazard Mater. – 2008 – 59 – pp.187–203.
3. Voyno L.I. Biodegradation of oil-contaminated soils and waters / L.I. Voyno // Fundamental Research. – 2006 – 5 – pp. 68-70.

4. Dan L. Managing long-term polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soils: a risk-based approach / L. Dan, R. Naidu, P. Thavamani et al. // Environ. Sci. Pollut. Res. – 2015 – 22 – 12 – pp. 8927–9841.
5. Брянская А.В. Теоретические и практические вопросы биологического окисления углеводородов микроорганизмами / А.В. Брянская, Ю.Е. Уварова, Н.М. Слинко и др. // Russian J. Genet.: Appl. Res. – 2015 – 4 – С. 383–393.
6. Ратушняк А.А. Токсическое действие нефти и продуктов ее переработки на *Daphnia magna* Straus / А.А. Ратушняк, М.Г. Андреева, В.З. Латыпова и др. // Гидробиол. журнал. – 2000 – 3 – С. 25–29.
7. Varjani S.J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons / S.J. Varjani / Bioresour. Technol. – 2017 – 223 – pp. 277–286.
8. Vilchez-Vargas R. Metabolic networks, microbial ecology and ‘omics’ technologies: towards understanding in situ biodegradation processes. / R. Vilchez-Vargas, H. Junca, D.H. Pieper // Environ. Microbiol. – 2010 – 12 – pp. 3089–3104.
9. Шарапова И.Э. Использование интегрального коэффициента биологической активности почвы и индекса фитотоксичности для оценки фиторемедиации нефтезагрязненных почв / И.Э. Шарапова, Е.М. Лаптева, С.П. Маслова и др. // Теоретическая и прикладная экология. – 2015 – 2 – С. 67–73.
10. Шарапова И.Э. Влияние состава питательных сред на продуктивность и биологическую активность штамма энтопатогенного гриба *Beauveria bassiana* / И.Э. Шарапова // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2021 – 22 – 6 – С. 918–927.
11. Петрикевич С.Б. Оценка углеводородоксилирующей активности микроорганизмов / С.Б. Петрикевич, Е.Н. Кобзев, А.Н. Шкидченко // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003 – 39 – 1 – С. 25–30
12. Рабинович М.Л. Грибковое разложение природных ароматических структур и ксенобиотиков: обзор / М.Л. Рабинович, А.В. Болובהва, Л.Г. Васильченко // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004 – 40 – 1 – С.1–17
13. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии. / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук // М: Издательский центр «Академия» – 2005 – 608 с.
14. Aerobic biodegradation of xylene with biomass increase – URL: <https://www.hydrochemistry.eu/exmpls/xylene.html> (accessed: 13.09.2022)

References in English

1. Maxmen A. Crop pests: under attack / A. Maxmen // Nature. – 2013 – 501 – pp.15-17. – URL: <https://www.nature.com/articles/501S15a> (accessed: 13.09.2022)
2. Gikas P. Single and combined effects of nickel (Ni(II)) and cobalt (Co(II)) ions on activated sludge and on other aerobic microorganisms: a review / P. Gikas // J Hazard Mater. – 2008 – 59 – pp.187–203.
3. Voyno L.I. Biodegradation of oil-contaminated soils and waters / L.I. Voyno // Fundamental Research. – 2006 – 5 – pp. 68–70.
4. Dan L. Managing long-term polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soils: a risk-based approach / L. Dan, R. Naidu, P. Thavamani et al. // Environ. Sci. Pollut. Res. – 2015 – 22 – 12 – pp. 8927–9841.
5. Bryanskaya A. Teoreticheskie i prakticheskie voprosy biologicheskogo okisleniya uglevodorodov mikroorganizmami [Theoretical and practical issues of biological oxidation of hydrocarbons by microorganisms] / A.V. Bryanskaya, Yu.E. Uvarova, N.M. Slinko et al. // Russian J. Genet.: Appl. Res. – 2015 – 4 – pp. 383–393 [in Russian]
6. Ratushnyak A.A. Toksicheskoe dejstvie nefiti i produktov ee pererabotki na *Daphnia magna* Straus [Toxic effect of oil and its refined products on *Daphnia magna* Straus] / A.A. Ratushnyak, M.G. Andreeva, V.Z. Latypova et al. // Gidrobiol. zhurnal. [Hydrobiol. magazine]. – 2000 – 3 – pp. 25–29 [in Russian]
7. Varjani S.J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons / S.J. Varjani / Bioresour. Technol. – 2017 – 223 – pp. 277–286.
8. Vilchez-Vargas R. Metabolic networks, microbial ecology and ‘omics’ technologies: towards understanding in situ biodegradation processes. / R. Vilchez-Vargas, H. Junca, D.H. Pieper // Environ. Microbiol. – 2010 – 12 – pp. 3089–3104.
9. Sharapova I.E. Ispol'zovanie integral'nogo koeffitsienta biologicheskoy aktivnosti pochvy i indeksa fitotoksichnosti dlya ocenki fitoremediacii neftezagryaznennyh pochv [The use of the integral coefficient of biological activity of the soil and the phytotoxicity index to assess the phytoremediation of oil-contaminated soils] / I.E. Sharapova, E.M. Lapteva, S.P. Maslova et al. // Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya [Theoretical and applied ecology]. – 2015 – 2 – pp. 67–73 [in Russian]
10. Sharapova I.E. Vliyanie sostava pitatel'nyh sred na produktivnost' i biologicheskuyu aktivnost' shtamma entomopatogenogo griba *Beauveria bassiana* [The influence of the composition of nutrient media on the productivity and biological activity of the strain of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*] / I.E. Sharapova // Agrarnaya nauka Euro-Severo-Vostoka [Agrarian science of the Euro-North-East]. – 2021 – 22 – 6 – pp. 918–927 [in Russian]
11. Petrikevich S.B. Ocenka uglevodorodokislyayushchej aktivnosti mikroorganizmov [Assessment of hydrocarbon-oxidizing activity of microorganisms] / S.B. Petrikevich, E.N. Kobzev, A.N. Shkidchenko // Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya [Applied biochemistry and microbiology]. – 2003 – 39 – 1 – pp. 25–30 [in Russian]
12. Rabinovich M.L. Gribovoe razlozhenie prirodnyh aromatcheskih struktur i ksenobiotikov: obzor [Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: review] / M.L. Rabinovich, A.V. Bolobova, L.G. Vasilchenko // Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya [Applied biochemistry and microbiology]. – 2004 – 40 – 1 – pp.1–17 [in Russian]
13. Netrusov A.I. Praktikum po mikrobiologii [Workshop on microbiology] / A.I. Netrusov, M.A. Egorova, L.M. Zakharchuk // M: Publishing center “Academy” – 2005 – 608 p. [in Russian]
14. Aerobic biodegradation of xylene with biomass increase – URL: <https://www.hydrochemistry.eu/exmpls/xylene.html> (accessed: 13.09.2022)