

УДК 579.695 + 546.85 + 665.61

ШТАММ *ASPERGILLUS NIGER* AM1 КАК АГЕНТ БИОДЕГРАДАЦИИ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

© 2024 г. А. З. Миндубаев^{1,*}, Э. В. Бабынин^{2,**}, В. М. Бабаев^{3,***}, В. В. Тутучкина^{3,****}, С. Т. Минзанова^{3,*****}, Л. Г. Миронова^{3,*****}, Ю. В. Караева^{1,*****}

¹ Казанский национальный исследовательский технологический университет, 420015 Казань, Россия

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008 Казань, Россия

³ Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра РАН, 420088 Казань, Россия

*e-mail: mindubaev@iopc.ru

**e-mail: edward.b67@mail.ru

***e-mail: babaev-84@mail.ru

****e-mail: tutuchkinav@mail.ru

*****e-mail: minzanova@iopc.ru

*****e-mail: mironoval1963@gmail.com

*****e-mail: julieenergy@list.ru

Поступила в редакцию 21.06.2023 г.

После доработки 27.09.2023 г.

Принята к публикации 28.12.2023 г.

Исследована биодegradация нефтей штаммом *Aspergillus niger* AM1 ВКМ F-4815D. Визуальное наблюдение и хроматомасс-спектрометрия показали, что нефть подвергается частичной деструкции, но не может служить единственным источником углерода — в культуральной среде должна содержаться глюкоза. Интересным фактом является изменение консистенции, отвердения нефти под влиянием *A. niger*. Это позволяет рассматривать возможность использования штамма для биоремедиации почв и вод, загрязненных нефтью. Не менее интересно то, что еще ранее для штамма была установлена способность метаболизировать ряд токсичных соединений фосфора, включая даже белый и красный фосфор. Однако органические растворители в большинстве оказывают заметное токсическое действие, замедляя рост в присутствии глюкозы и не становясь источниками углерода в отсутствие глюкозы.

Ключевые слова: биодegradация, масс-спектрометрия, нефтепродукты, нефть, *Aspergillus*.

DOI: 10.31857/S0026364824010037, **EDN:** mbmhiy

В наших публикациях (Mindubaev et al., 2020, 2021) впервые описано биологическое окисление белого фосфора в полезный для жизнедеятельности фосфат. Дальнейший ход наших исследований был связан с расширением спектра соединений, подвергаемых биодegradации. Он включал разнообразные соединения фосфора, органические и неорганические, в различных степенях окисления. Интересно дальнейшее расширение спектра и включение в него загрязнителей, не содержащих фосфор. Наш выбор пал на нефти и нефтепродукты — основные загрязнители окружающей среды на сегодняшний день. Нефтепродукты в плане токсичности менее опасны для окружающей среды, чем соединения фосфора, но производятся

и потребляются в значительно больших объемах. Поэтому в целом опасность загрязнения этим классом поллютантов значительно выше. В случае положительных результатов работы существенно расширится сфера применения исследуемых нами штаммов аспергиллов, поскольку появится возможность обезвреживать более значительные масштабы загрязнений.

Штаммы *Aspergillus* относятся к включающему многие виды роду высших аэробных плесневых грибов, распространенных по всему миру (Pegone et al., 2007). *Aspergillus niger* уже сто с лишним лет находит широкое применение в биотехнологической промышленности (Cairns et al., 2018). Использование различных штаммов рода *Aspergillus*

для биodeградации токсичных соединений представлено в ряде исследований. Например, в исследовании Кхан с соавторами (Khan et al., 2017) *A. tubingensis* использовался для биodeградации полиэфирного полиуретана, широко применяемого в промышленности полимера. Оценка биodeградации полиэтилена, полистирола и полипропилена с использованием *A. flavus* проведена в работе (Santacoloma-Londoño, 2019). Результаты экспериментальных исследований биodeградации полиэтилена высокой плотности с использованием *A. versicolor* и *A. terreus* представлены в публикации (Singh et al., 2012). В обзоре (Pathak, 2017) указана возможность утилизации полиэтилена и поливинилхлорида *A. niger*, поли-3-полигидроксibuтирата с применением *A. fumigatus*, поликапролактона при помощи *A. flavus*.

Для биodeградации фенола применяли *A. niger* (Supriya, Neehar, 2014) а также антарктические штаммы *A. fumigatus* (Gerginova et al., 2013). *A. niger* использовали и для утилизации бензола и толуола (Perdana et al., 2019).

Возможности очистки почвы от загрязнения сырой нефтью с помощью *A. oryzae* рассмотрены в исследовании Asemoloye et al. (2020). Ал-Хаваш с соавторами (Al-Hawash et al., 2019) установлено, что *Aspergillus* sp. RFC-1 может адсорбировать, поглощать и деградировать сырую нефть и три типа полициклических ароматических углеводородов, которые являются высокотоксичными соединениями сложного строения. Более 80% полициклических ароматических углеводородов (нефтяных фракций) было удалено из воды произрастающими в ней местными видами грибов *A. fumigatus* после 120 дней воздействия (Окого, Amund, 2010).

В работе (Singh, Walker, 2006) упоминается использование *A. niger* для биodeградации соединений со связями фосфор — углерод.

Таким образом, грибы рода *Aspergillus* можно рассматривать в качестве эффективного средства очистки окружающей среды от загрязнителей различной химической природы. Цель настоящей работы — исследование способности штамма *A. niger*, выделенного из навески белого фосфора к биodeградации нефти и нефтепродуктов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Происхождение штамма. Штамм *A. niger* AM1 ВКМ F-4815D был выделен 07.10.2014 из навески белого фосфора, приобретенного в ПАО “Химпром” (г. Новочебоксарск). Куски этого вещества технической чистоты хранились в банке из темного стекла, заполненной водой.

Культурально-морфологические и микроскопические особенности штамма. Определение культурально-морфологических характеристик штамма проведены с использованием сайта коллекции CBS (Голландия) и руководства по роду *Aspergillus* (Bilay, Koval, 1988).

Колонии на картофельно-глюкозном агаре (КГА) при 25°C через 9 сут имеют диаметр 58 мм, черные, поверхность зернистая, край ровный; мицелий белый, септированный, экссудат в чашке не обнаружен. Конидиальные головки шаровидные. Конидиеносцы несептированные, гладкостенные, со средним размером 960–1150 × 9–11 мкм. Везикулы сферические, диаметр около 58 мкм; конидиогенные структуры двухъярусные, метулы очень плотно покрывают всю поверхность везикулы. Конидии черные, шаровидные, около 4 мкм в диам., толстостенные, поверхность шероховатая (рис. 2). При росте на высоких (более 0.2%) концентрациях белого фосфора мицелий гриба приобретает желтый цвет. Споры аспергилла хранятся в пробирке с завинчивающейся крышкой, заполненной 30%-м водным глицерином, при температуре –30°C. Культура относится к IV группе патогенности в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами, утвержденными Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2008 № 4 “Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителям паразитарных болезней” (СП 1.3.2322–08).

Культуры высевали в планшеты Corning, скорость роста оценивали микропланшетным ридером Infinite F200 Pro, Tecan (Австрия). Посев производили в среду состава (г/л): NaCl — 2.5, MgSO₄ — 0.5, KNO₃ — 2.0, глюкоза — 8.0.

Оценка способности штамма к биodeградации нефти и нефтепродуктов. Нефть и нефтепродукты значительно менее токсичны, чем ряд соединений фосфора, но гораздо шире используются и в больших количествах поступают в окружающую среду. Ниже показаны субстраты, использованные в исследовании штамма *A. niger* AM1 ВКМ F-4815D:

Исследованные нефти сильно различаются по вязкости: нефть с Ново-Шешминского месторождения Татарстана имеет примерно в 100 раз более высокую вязкость, чем месторождение Первомайское.

Химическая идентификация. Хроматомасс-спектрометрическое (ГХ–МС) исследование проводилось на газовом хроматографе “Agilent 6890N” с масс-спектрометрическим детектором 5973 N (Agilent Technologies, США). Метод ионизации — электронная ионизация (70 эВ). Температура источника ионов — 230°C. Диапазон масс 33–550

Месторождение	Обозначение	Градусы API	Вязкость (при 20 °С), мПа × с
Первомайское	Первомайск.	27.6	37.88
Ново-Шешминское	№ 13	13.74	3805.00

а. е. м. Идентификация компонентов проводилась с использованием библиотеки масс-спектров NIST-17. Использовалась неполярная капиллярная колонка HP-5 MS (5%-й дифенил-, 95%-й диметилполисилоксан), длиной 30 м с внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной пленки фазы 0.25 мкм. Условия газохроматографического разделения: объем вводимой пробы — 1 мкл, температура узла ввода проб (инжектора) — 280°C, режим ввода пробы с делением потока (5 : 1), газ-носитель — гелий с расходом 0.7 мл/мин, начальная температура термостата колонки — 40°C, термостатирование — 2 мин, скорость увеличения температуры 10°C/мин до 100°C термостатирование — 2 мин, скорость увеличения температуры 20°C/мин, конечная температура термостата колонки — 280°C, термостатирование — 20 мин.

Образцы нефтей растворяли в хлористом метиле (добавляли 500 мкл хлористого метилена к образцу). В качестве внутреннего стандарта использовался гидроксibuтилтолуол.

Пробоподготовка. Посев для ГХ–МС производился в фальконы. Всего шесть проб: две нефти, варианты с глюкозой, без глюкозы и стерильная нефть без посева гриба (негативный контроль, НК). Объем сред по 2 мл, количество добавляемых нефтей приблизительно — вследствие высокой вязкости невозможно внесение точных навесок. Кроме того, отдельно отдавали на анализ нефтяные и водные фракции каждой пробы: итого 12 образцов, которые отбирали в эппендорфы. На момент отбора проб возраст культуры составлял 21 сут. Нефтяные фракции разбавлялись растворителем до объема 2 мл. В качестве растворителя использовали метилхлорид, поскольку он отлично растворяет компоненты нефтей, но сам в их состав не входит. Следовательно, не станет помехой при анализе.

Скрининговый тест на использование углеводов. Изоляты были протестированы на их способность использовать в качестве источника углерода (Bidoia et al., 2010). Чистый штамм инокулировали в 3 мл культуральной среды, содержащего 50 мкл каждого испытуемого субстрата. Затем добавляли 40 мкл 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДСРIP) и инкубировали при 28°C. ДСРIP получали растворением 1 г порошка ДСРIP в 1 л стерильной дистиллированной воды (Mariano et al., 2008).

Путем включения акцептора электронов, такого как ДСРIP, в культуральную среду можно установить способность микроорганизма использовать субстрат, наблюдая изменение цвета ДСРIP от синего (окисленного) до бесцветного (восстановленного) в технологии скрининга, о которой впервые сообщалось для применения в биодеградационной нефти (Hanson et al., 1993).

Рост на летучих органических веществах происходил в закрытых фальконах, аналогично посеву для ГХ–МС. Фальконы плотно закрывались во избежание испарения веществ. Однако время от времени фальконы открывали на короткое время, чтобы обеспечивать поступление кислорода воздуха, необходимого для жизнедеятельности культуры *A. niger*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обращает на себя внимание то, что в присутствии микроорганизмов нефти претерпевают изменения. На 18-е сут после посева стало заметно, что в среде, содержащей глюкозу в качестве основного источника углерода, нефть изменила консистенцию: утратила текучесть и собралась в комки (Minbubaev et al., 2023). Эти изменения коснулись нефтей из обоих месторождений. В среде без глюкозы нефти остались без изменений — по всей видимости, рост *A. niger* в ней не начался. На 31-е сут подобные изменения стали происходить с нефтями в отсутствие глюкозы. Но поскольку нефти не были автоклавированы, а в среде без глюкозы не отмечался рост мицелия, возникло предположение, что нефти подвергаются деструкции бактериями, которые присутствовали в них изначально.

Повторили посев, предварительно автоклавировав нефти при 120°C. В этом случае в среде без глюкозы биодеструкция не наблюдается даже спустя 51-е сут после посева. Однако в среде с глюкозой мицелий растет, а нефть комкуется. Причем менее вязкая нефть с месторождения Первомайское визуально трансформируется быстрее, чем более вязкая с Ново-Шешминского месторождения (рис. 1).

Безусловно, эти первые результаты интересны и могут указывать на способность *A. niger* AM1 осуществлять биодегградацию нефти. Однако визуальной оценки для такого заключения недостаточно. Комкование нефти не обязательно связано

с ее метаболизмом. Микроорганизмы могут вырывать поверхностно-активные вещества, биосурфактанты, способные менять консистенцию гидрофобных субстратов (Kubicki et al., 2019). Поэтому мы провели углубленное исследование методом газовой хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией (ГХ–МС).

Надо отметить, что в посеве в фальконы, сделанном специально для ГХ–МС исследования, наблюдается схожая картина: *A. niger* AM1 растет только в присутствии сахара, т.е. компоненты нефти заведомо не могут служить ему полноценным источником углерода. Однако свойства нефти в присутствии аспергилла претерпевают изменения. В пробирках с посевом нефтяная фракция распределяется по поверхности водной фазы среды равномерно, образуя черную пленку, а в стерильных условиях нефти собираются у стенок фальконов и в середине образуется пятно водной фазы, свободное от нефти.

Методом ГХ–МС в водных фракциях сред никаких сигналов обнаружено не было. Поэтому в работе представлены спектры исключительно нефтяных фракций.

Усредненное из трех анализов ГХ–МС количество сигналов в стерильной нефти месторождения Первомайское (негативный контроль), нефти с посевом AM1 без глюкозы и с глюкозой, составило 22, 21 и 9 соответственно, т.е. в присутствии глюкозы в качестве основного источника углерода нефть подвергается глубокой деструкции микромицетом *A. niger*. Без глюкозы деструкция тоже происходит, но медленная и неглубокая. Эти результаты анализа совпадают с визуальной оценкой, согласно которой в положительном контроле без глюкозы видимый рост мицелия не наблюдается. Можно предположить, что *A. niger* в отсутствие глюкозы потребляет содержащиеся в нефти вещества биологического, главным образом, бактериального, происхождения.

Для нефти с месторождения Первомайское получены следующие результаты химического состава. Наименьшее количество компонентов, выявленных ГХ–МС, в варианте с глюкозой — 18 (рис. 2). В этом варианте появляются сигналы соединений, окисленных кислородом (кетонов, лактонов). Это означает, что разросшаяся на глюкозе биомасса гриба осуществляет биodeградацию компонентов нефти. Гриб в первую очередь метаболизирует алканы как нормального, так и разветвленного строения. Ароматические соединения разлагаются хуже. Кроме того, хорошо разложились компоненты нефти явно биологического происхождения — триацилглицерины (триглицериды) и амид гексадеценовой кислоты. Вероятно, эти соединения

образованы обитавшими в нефти бактериями, погибшими в результате автоклавирования.

Наиболее сложный состав (39 компонентов) в негативном контроле в стерильной нефти. В посеве *A. niger* AM1 без глюкозы количество компонентов составляет промежуточную величину, равную 30. Из этого можно сделать заключение, что аспергилл способен существовать в присутствии нефти в качестве единственного источника углерода и осуществлять ее биodeградацию, однако процесс этот очень медленный, а биodeструкция менее глубокая, чем в присутствии глюкозы. Данный результат тоже хорошо соотносится с представленными выше.

Обращает внимание отсутствие сигналов легких компонентов (например, низших алканов) во всех трех вариантах. Мы предполагаем, что они испарились из нефти во время автоклавирования. Съемка спектров проводилась трижды, и во всех трех повторах наблюдалась хорошая сходимость результатов — значит, они достоверны.

Хроматограмма нефти с Ново-Шешминского месторождения оказалась “бедной”. Ее компоненты плохо разделились методом ГХ–МС, что затрудняет интерпретацию результатов. Вероятно, все дело в высокой вязкости этой нефти и предполагаемой высокой молекулярной массе ее компонентов. Они могли неподвижно закрепиться в сорбенте колонки. Обе нефти содержат необычный компонент три(–2,4-бис-*трет*-бутилфенил) фосфит. Предполагаем, что это — искусственный антиокислитель, специально добавляемый в нефти, либо попавший в них при контакте с пробками из резины.

Таким образом, нет сомнений в том, что нефти подвергаются биodeградации *A. niger* AM1, по крайней мере, частичной. Однако нефть — сложная многокомпонентная система. Это создает трудности в изучении ряда ее свойств. Конечно, необходимо исследовать биodeградацию не только сырых нефтей, но и химически чистых нефтепродуктов. Мы выбрали два алкана — *n*-гексан и изооктан (2,2,4-триметилпентан) и два арена — бензол и толуол (метилбензол). Кроме того, проверили биodeградацию ацетонитрила — это вещество не входит в состав нефтей, но, в отличие от других исследуемых веществ, смешивается с водой и должно равномерно распределяться в толще среды.

Рост на нефтепродуктах описывается теми же закономерностями, что рост на нефтях. Гриб развивается только в присутствии глюкозы. Наименьшую токсичность в среде с глюкозой продемонстрировал изооктан: в его присутствии *A. niger* развился до стадии спороношения. В среде

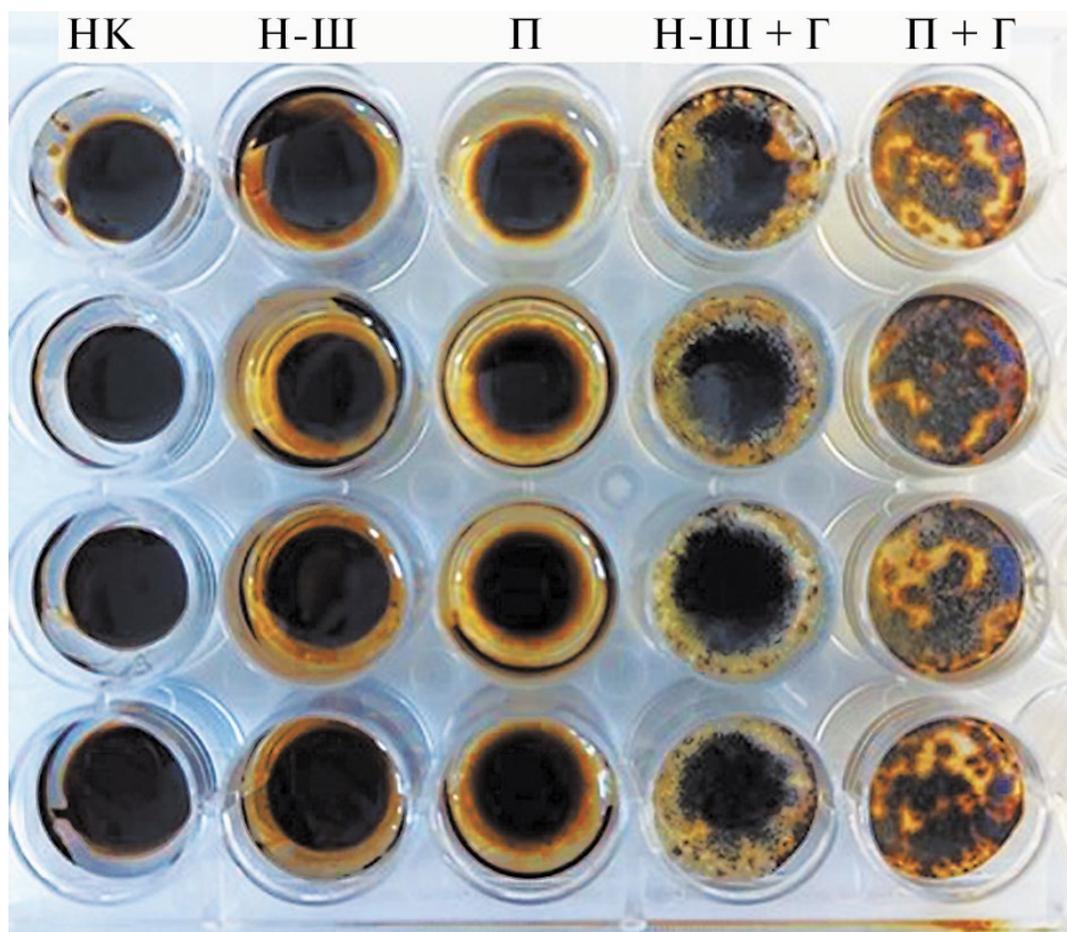


Рис. 1. Пробы нефти, инокулированные штаммом *Aspergillus niger* AM1: Г – глюкоза; НК – негативный контроль; Н-Ш – нефть Ново-Шешминского месторождения; П – нефть Первомайского месторождения. Рост мицелия заметен только в присутствии глюкозы. Снимок сделан на 36-е сут после посева.

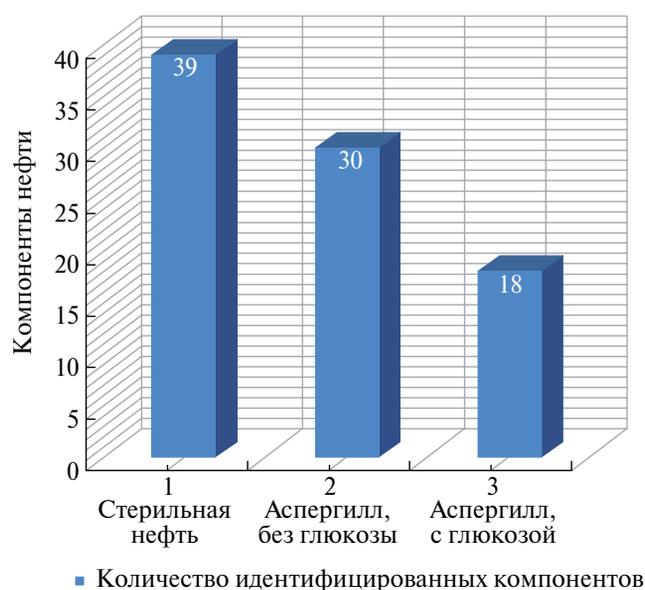


Рис. 2. Снижение количества компонентов нефти с Первомайского месторождения в результате биодеструкции грибом *Aspergillus niger* AM1.

с гексаном гриб тоже дал споры, но размер колонии был значительно меньше. В присутствии бензола и ацетонитрила образовался аспорогенный воздушный мицелий белого цвета. Наибольшую токсичность показал толуол: в среде с ним рост остановился на стадии субстратного мицелия. Эти результаты соотносятся с литературными данными, согласно которым грибы рода *Aspergillus* способны подвергать биodeградации парафиновый воск, состоящий преимущественно из высших *n*-алканов (Zhang et al., 2015). Следует, однако, иметь в виду, что свойства высших алканов с длиной цепи до C₅₀ и низших (гексан и изооктан) заметно различаются, как и их токсичность для микроорганизмов. В литературных источниках есть сведения о биodeградации ароматического вещества фенола культурами *A. niger* (Tebbouche et al., 2015). Фенол, в свою очередь, является метаболитом бензола (Morgan, Greenberg, 2010). Тем не менее следует иметь в виду, что различные штаммы даже одного вида могут иметь выраженные отличия.

Итак, во всех случаях визуально заметный рост отсутствовал в среде без глюкозы. Интерес представляло выяснение вопроса, протекают ли минимальные метаболические процессы в средах с нефтепродуктами в качестве единственных источников углерода. В опытах с сырой нефтью, по всей видимости, протекают, однако для чистых соединений этот результат следовало уточнить. Для этого в негативный и позитивный контроли — стерильную среду с ацетонитрилом и посев в среду с ацетонитрилом без глюкозы — добавили краситель 2,6-дихлорфенолиндофенол, имеющий голубой цвет, но восстанавливаемый в процессе микробного метаболизма до бесцветного производного. Сравнение окраски среды в обоих случаях продемонстрировало ее практически полную тождественность (рис. 3), т.е. даже если метаболические процессы в отсутствие глюкозы можно зафиксировать, они были на уровне статистической погрешности.

Таким образом, ароматические соединения и нитрилы оказывают на *A. niger* AM1 более выраженное токсическое действие в сравнении с алифатическими углеводородами.

В дальнейшем мы произвели посев AM1 на другой ряд растворителей — галогенорганическое соединение 1,2-дихлорэтан, двухатомный спирт этиленгликоль (этандиол) и сложный эфир этилацетат (укусноэтиловый эфир). Следует сразу отметить, что и в данном случае рост наблюдался только в присутствии глюкозы как основного источника углерода. Этилацетат практически не угнетает рост, наибольшую токсичность проявил

дихлорэтан. Результат вполне объяснимый, если иметь в виду сведения о токсичности перечисленных соединений. Тем не менее в присутствии глюкозы все посевы *A. niger* AM1 достигли стадии спороношения. Это указывает на сравнительно низкую токсичность для грибов данных соединений.

Изначально предполагалось, что этилацетат, будучи сложным эфиром уксусной кислоты, может поддерживать рост гриба в отсутствие глюкозы. Но это предположение не подтвердилось — соединение оказалось трудноусваиваемым источником углерода.

Также мы предполагали, что метаболизм дихлорэтана должен сопровождаться отщеплением хлора в виде сильной соляной (хлористоводородной) кислоты. Было измерено рН среды при помощи индикаторной бумаги главным образом для того, чтобы установить метаболизм хлорорганического соединения. Выяснилось, что в процессе роста гриб закисляет культуральные среды до слабокислой реакции (минимальное значение рН = 4 в контроле с глюкозой). Вероятно, в процессе роста гриб сбрасывает глюкозу до слабых органических кислот, незначительно снижающих рН среды.

Однако предполагаемое особенно резкое закисление среды с дихлорэтаном не наблюдалось, даже при росте гриба в среде с глюкозой. Из этого следует либо отсутствие метаболизма данного соединения, либо метаболизм без отщепления неорганических хлорид-ионов. Возможно, сыграла роль низкая растворимость дихлорэтана в воде (0.87 г/100 мл) и высокая плотность (1.25 г/мл), из-за чего жидкость скапливается на дне пробирки и мало контактирует с мицелием *A. niger*. Этим же можно объяснить слабое токсическое действие дихлорэтана, который известен как один из самых токсичных растворителей.

В дальнейшем произвели посев еще на два летучих органических вещества — одноатомный спирт изопропанол (2-пропанол) и паральдегид (2,4,6-триметил-1,3,5-триоксан). В качестве позитивного контроля, помимо глюкозы, использовали оливковое масло в качестве источника углерода. Главным компонентом растительных масел являются триацилглицерины — сложные эфиры глицерина и ненасыщенных жирных кислот. Кроме того, повторили посев на одну из нефтей.

Результат посева подтвердил предыдущие результаты. Рост на изопропанол и паральдегиде оказался возможен только в присутствии глюкозы. Оба летучих соединения угнетали рост *A. niger*, при этом паральдегид неожиданно проявил особенно высокую токсичность, сильно превышающую таковую дихлорэтана. На нефти в отсутствие глюкозы

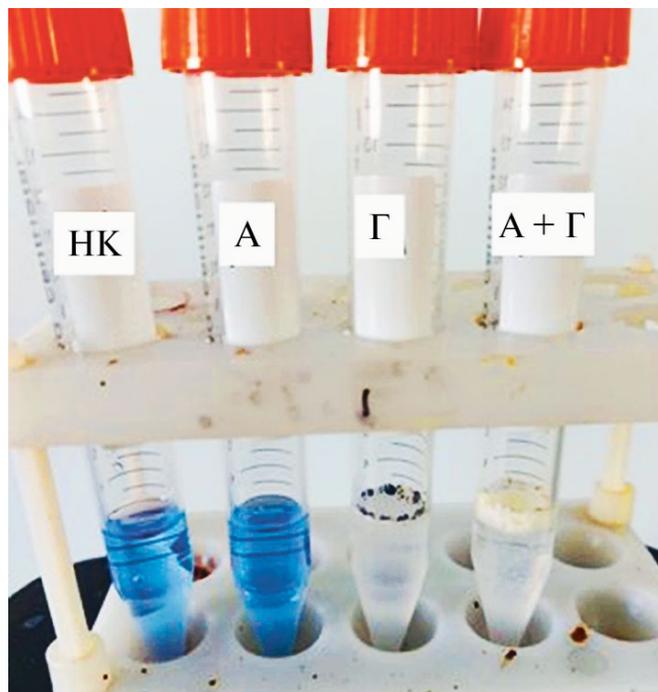


Рис. 3. Рост *Aspergillus niger* AM1 на ацетонитриле: А – ацетонитрил; Г – глюкоза; НК – негативный контроль. Голубая окраска окисленного 2,6-дихлорфенолиндофенола свидетельствует об отсутствии метаболических процессов. Отсутствие окраски у восстановленного красителя свидетельствует о жизнедеятельности *A. niger*. Снимок сделан на 26-е сут после посева.

видимый рост не наблюдается, а оливковое масло служит грибу источником углерода, хотя рост сильно отстает от контроля с глюкозой. На 12-е сут после посева в положительных контролях *A. niger* уже вступил в фазу спорообразования, на изопропанол с глюкозой вступил в фазу воздушного мицелия без спор, на паральдегиде с глюкозой остался в фазе субстратного мицелия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Можно сделать вывод о том, что нефти подвергаются частичной биодegradации нашим штаммом *A. niger* AM1, но только при наличии дополнительных легкоусваиваемых источников углерода. В принципе, дорогостоящую глюкозу можно заменить сельскохозяйственными отходами. С ростом вязкости нефти биодegradация замедляется. При этом нефти меняют консистенцию и становятся комковатыми. В перспективе это открывает возможности для создания методов сбора нефти, поскольку комки собираются легче, чем жидкая пленка. Не только сырые нефти, но и чистые органические вещества, близкие к нефтепродуктам, поддерживают рост *A. niger* AM1 только в присутствии глюкозы.

Следует отметить широкую применимость штамма, который способен еще и обезвреживать

соединения фосфора и даже белый фосфор — его биодegradацию мы наблюдали впервые в мире. Предполагается, что за окисление поллютантов разной природы отвечают одни и те же ферментные системы, но это предположение — тема будущего, более углубленного исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Al-Hawash A.B., Zhang X., Ma F.* Removal and biodegradation of different petroleum hydrocarbons using the filamentous fungus *Aspergillus* sp. RFC-1. *Microbiology Open*. 2019. V.8 (1). P. e00619. <https://doi.org/10.1002/mbo3.619>
- Asemoloye M.D., Tosi S., Daccò C. et al.* Hydrocarbon degradation and enzyme activities of *Aspergillus oryzae* and *Mucor irregularis* isolated from Nigerian crude oil-polluted sites. *Microorganisms*. 2020. V. 8 (12). P. 1–19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121912>
- Bidoia E.D., Montagnolli R.N., Lopes P.R.M.* Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. In: A. Mendez-Vilas (ed.). *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. Badajoz, 2010, pp. 1277–1288.
- Bilay V.I., Koval E.Z.* *Aspergilli*. Key-book. Naukova Dumka, Kiev, 1988 (in Russ.).
- Cairns T.C., Nai C., Meyer V.* How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research.

- Fungal Biol. Biotechnol. 2018. V. 5 (13). P. 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40694-018-0054-5>
- Gerginova M., Manasiev J., Yemendzhiev H. et al. Biodegradation of phenol by Antarctic strains of *Aspergillus fumigatus*. Zeitschr. Naturforschung C. 2013. V. 68 (9–10). P. 384–393. <https://doi.org/10.1515/znc-2013-9-1006>
- Hanson K.G., Desai J.D., Desai A.J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. Biotechnol. Tech. 1993. V. 7 (10). P. 745–748. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220080001000028>
- Herrera-Gallardo B.E., Guzmán-Gil R., Colín-Luna J.A. et al. Atrazine biodegradation in soil by *Aspergillus niger*. Can J. Chemical Engineering. 2021. V. 99 (4). P. 932–946. <https://doi.org/10.1002/cjce.23924>
- Khan S., Nadir S., Shah Z. et al. Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*. Environm. Pollut. 2017. V. 225. P. 469–480. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.012>
- Kubicki S., Bollinger A., Katzke N. et al. Marine biosurfactants: biosynthesis, structural diversity and biotechnological applications. Mar. Drugs. 2019. V. 17 (408). P. 1–30. <https://doi.org/10.3390/md17070408>
- Mariano A.P., Bonotto D.M., Angelis D.F. et al. Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. Brazilian J. Microbiol. 2008. V. 39. P. 33–142.
- Mindubaev A.Z., Kuznetsova S.V., Evtyugin V.G. et al. Effect of white phosphorus on the survival, cellular morphology, and proteome of *Aspergillus niger*. Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. 2020. V. 56 (2). P. 194–201 (in Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0003683820020118>
- Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Bedeeva E.K. et al. Biological degradation of yellow (white) phosphorus, a compound of first class hazard. Russian J. Inorganic Chem. 2021. V. 66 (8). P. 1239–1244. <https://doi.org/10.1134/S0036023621080155>
- Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Minzanova S.T. et al. A method for oil detoxification using the *Aspergillus niger* strain AM1VKM F-4815D. RF patent. 2023. № 2791735.
- Morgan J., Greenberg A. Insights into the formation and isomerization of the benzene metabolite muconaldehyde and related molecules: comparison of computational and experimental studies of simple, benzo-annelated, and bridged 2,3-epoxyoxepins. J. Org. Chem. 2010. V. 75 (14). P. 4761–4768. <https://doi.org/10.1021/jo100610g>
- Okoro C.C., Amund O.O. Biodegradation of produced water hydrocarbons by *Aspergillus fumigatus*. J. American Sci. 2010. V. 6 (3). P. 143–149. <https://doi.org/10.12691/jaem-2-2-3>
- Pathak V.M. Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach. Biores. Bioprocessing. 2017. V. 4 (15). P. 1–31. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0145-9>
- Perdana A.T., Arianata M., Larasati T.R.D. Optimization of benzene and toluene biodegradation by *Aspergillus niger* and *Phanerochaete chrysosporium*. J. Al-Azhar Indonesia Ser. Sains Dan Teknol. 2019. V. 5 (2). P. 87–91. <https://doi.org/10.36722/sst.v5i2.355>
- Perrone G., Susca A., Cozzi G. et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. Stud. Mycol. 2007. Vol. 59. P. 53–66. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.07>
- Santacoloma-Londoño S.P. Evaluation of the biodegradation of polyethylene, polystyrene and polypropylene, through controlled tests in solid suspension with the fungus *Aspergillus flavus*. Scientia et Technica. 2019. V. 24 (3). P. 532–540. <https://doi.org/10.22517/23447214.20731>
- Singh B.K., Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. FEMS Microbiol. Rev. 2006. V. 30. № 3. P. 428–471. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x>
- Singh V., Dubey M., Bhadauria S. Biodeterioration of polyethylene high density by *Aspergillus versicolor* and *Aspergillus terreus*. J. Advanced Laboratory Res. Biol. 2012. V. 3 (1). P. 47–49.
- Supriya C., Neehar D. Biodegradation of phenol by *Aspergillus niger*. IOSR J. Pharmacy. 2014. V. 4 (7). P. 11–17. <https://doi.org/10.9790/3013-0407011017>
- Tebbouche L., Hank D., Zeboudj S. et al. Evaluation of the phenol biodegradation by *Aspergillus niger*: application of full factorial design methodology. Desalination and Water Treatment. 2015. V. 7 (13). P. 1–7. <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1053991>
- Zhang J., Xue Q., Gao H. et al. Biodegradation of paraffin wax by crude *Aspergillus* enzyme preparations for potential use in removing paraffin deposits. J. Basic Microbiol. 2015. V. 55 (11). P. 1326–1335. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500290>
- Билай В.И., Коваль Э.З. (Bilay, Koval) Аспергиллы. Определитель. Киев: Наук. думка, 1988. 204 с.
- Миндубаев А.З., Кузнецова С.В., Евтюгин В.Г. и др. (Mindubaev et al.) Влияние белого фосфора на выживаемость, клеточную морфологию и протеом *Aspergillus niger* // Прикладная биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 2. С. 194–201.
- Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Минзанова С.Т. и др. Способ детоксикации нефти с применением штамма *Aspergillus niger* AM1VKM F-4815D. Патент РФ. 2023. № 2791735.

***Aspergillus niger* AN1 strain as causative agent for oil and petroleum products biodegradation**

**A.Z. Mindubaev^{a,#}, E.V. Babynin^{b,##}, V.M. Babaev^{c,###}, V.V. Tutuchkina^{c,####}, S.T. Minzanova^{c,#####},
L.G. Mironova^{c,#####}, and Yu.V. Karaeva^{a,#####}**

^a Kazan National Research Technological University, 420015 Kazan, Russia

^b Kazan (Volga Region) Federal University, 420008 Kazan, Russia

^c Institute of Organic and Physical Chemistry named after. A.E. Arbuzov Kazan Scientific Center RAS, 420088 Kazan, Russia

[#]e-mail: mindubaev@iopc.ru

^{##}e-mail: edward.b67@mail.ru

^{###}e-mail: babaev-84@mail.ru

^{####}e-mail: tutuchkinav@mail.ru

^{#####}e-mail: minzanova@iopc.ru

^{#####}e-mail: mironoval1963@gmail.com

^{#####}e-mail: julieenergy@list.ru

The biodegradation of oils by the strain *Aspergillus niger* AM1 VKM F-4815D was studied. Visual observation and gas chromatography-mass spectrometry showed that oil is subject to partial destruction, but cannot serve as the only source of carbon — the culture medium must contain glucose. An interesting fact is the change in consistency and hardening of oil under the influence of *A. niger*. This allows us to consider the possibility of using the strain for the bioremediation of soils and waters contaminated with oil. No less interesting is that, even earlier, the ability of the strain to metabolize a number of toxic phosphorus compounds, including even white and red phosphorus, was established. However, most organic solvents have a noticeable toxic effect, inhibiting growth in the presence of glucose and not becoming carbon sources in the absence of glucose.

Keywords: *Aspergillus*, biodegradation, mass spectrometry, oil, petroleum products.