

УДК 579.22
ББК 20.18

О.Ф. Вятчина
О.П. Горбачевская
Д.И. Стом
А.И. Беломестнова

**ХАРАКТЕРИСТИКИ ШТАММОВ
АЛКАНОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ,
ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ УДАЛЕНИЯ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕНИЙ***

Исследована субстратную специфичность штаммов бактерий, выделенных из гексадекана. Установлено, что изоляты обладают способностью к росту на широком круге органических соединений, в том числе на различных нефтепродуктах и жирах.

Ключевые слова: алканотрофные микроорганизмы, нефтепродукты, субстратная специфичность, резистентность.

O.F. Vyatchina
O.P. Gorbachevskaya
D.I. Stom
A.I. Belomestnova

**CHARACTERISTICS OF ALKANE-FEEDING STRAINS
OF MICROORGANISMS PROSPECTIVE FOR FIGHTING
OIL POLLUTION**

The authors study substrate specificity of bacterial strains isolated from hexadecane. It is established that isolats have ability to grow on wide range of organic compounds including oil-refinery products and lipids.

Keywords: alkane-feeding microorganisms, oil-refinery products, substrate specificity, resistance.

В настоящее время одной из актуальных проблем является ликвидация последствий загрязнения окружающей среды нефтью и нефтепродуктами. Наиболее перспективным и экологически безопасным способом элиминации подобных загрязнений является использование микроорганизмов — деструкторов углеводородов нефти [1]. Практический интерес представляют штаммы микроорганизмов, способные усваивать широкий спектр углеводородов и обладающие высокой токсикорезистентностью. В связи с этим целью данной работы явилось изучить некоторые свойства алканотрофных штаммов бактерий, выделенных из цетана.

В качестве объектов исследования использовали четыре бактериальных штамма, выделенных из хранившегося длительное время в лаборатории гексадекана: 1-05, 2-05, 1-04, 3-04. Для сравнения использовали культуру *Pseudomonas aeruginosa*, входящую в состав нефтеразрушающего микробиологического препарата «Деворойл» (препарат разработан в институте Микробиологии РАН и Научно-производственном предприятии «Биотехинвест») [3]. Препарат разработан в институте Микробиологии РАН и Научно-производственном предприятии «Биотехинвест».

* Работа выполнена при поддержке грантов Роснауки ФЦП (ГК 02.740.11.0018 от 15.06.2009 г. и ГК 02.740.11.0335 от 07.07.2009 г.).

Для выделения культур из цетана использовали метод глубинного посева в агаризованную синтетическую среду № 1 следующего состава (%): KNO_3 — 0,40; MgSO_4 — 0,08; KH_2PO_4 — 0,06; Na_2HPO_4 — 0,14; гексадекан — 1; агар-агар — 2; pH среды 7,2. Для определения способности микроорганизмов использовать в качестве источника углерода углеводы и спирты готовили основной фон среды следующего состава (г/л): пептон — 5,0; K_2HPO_4 — 1,0; pH 6,8. Углеводы или спирты вносили в количестве 1%. Для обнаружения изменения pH в среду добавляли индикатор бромкрезолпурпур — из расчета 2 мл 1,6%-го спиртового раствора на 1 л среды [2].

Исследование возможности роста культур на средах с индивидуальными углеводородами, формалином, карболовой кислотой, нефтепродуктами и жирами проводили при помощи метода «лунок».

В качестве фоновой среды использовали синтетическую среду следующего состава (%): KNO_3 — 0,40; MgSO_4 — 0,08; KH_2PO_4 — 0,06; Na_2HPO_4 — 0,14; агар-агар — 2,0; pH 7,2 [2]. Особенности роста каждого штамма изучали по шкале, разработанной Д.В. Хомяковой [4]. Также оценивали способность изолятов к росту в жидкой синтетической среде с нефтепродуктами. В колбы со 100 мл среды после стерилизации добавляли 1% соответствующего нефтепродукта. Для посева использовали суспензии односуточной культуры (1 мл на 100 мл среды). Инкубирование проводили на круговой качалке (180 об/мин.) при температуре 25 °C в течение 24 часов. Количественный контроль роста бактерий осуществляли при помощи метода серийных разведений с последующим высевом на чашки Петри с плотной синтетической средой с 1 % гексадекана.

Определение чувствительности к антибиотикам проводили с использованием диско-диффузионного метода [2]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Excel 2000 и общепринятых методов. Рассчитывали средние арифметические величины (M) и доверительные интервалы. Выводы сделаны при вероятности безошибочного прогноза $P \geq 0,95$.

Выделенные из гексадекана штаммы росли как на синтетической среде с гексадеканом, так и на белковых средах (рыбо-пептонный агар, мясо-пептонный бульон).

Культуры 1-05, 2-05, 1-04 могли развиваться за счет арабинозы, рамнозы, инозита, но не использовали сахарозу и сорбит. На глюкозе росли штаммы 1-05 и 2-05, лактозе 2-05, мальтозе — 2-05, дульците — 2-05. Эти три изолята обладали способностью к росту и на средах со следующими индивидуальными углеводородами: гексаном, октаном, изооктаном, деканом, декалином, ундеканом, додеканом, гексадеканом, ксилолом, изопропилбензолом, бензолом и нитробензолом. Штамм 3-04 не развивался ни на одном из используемых субстратов.

Выделенные из цетана штаммы представлены подвижными, неспорообразующими, грамотрицательными палочками, одиночными или парно соединенными.

Все штаммы, изолированные из цетана, не использовали сахарозу и сорбит. Арабинозу, рамнозу, инозит использовали культуры 1-05, 2-05, 1-04, лактозу — 2-05, мальтозу — 1-05, дульцит — 2-05. Глюкозу аэробно окисляли два штамма 1-05 и 2-05. Исследуемые микроорганизмы оказались каталаза- и оксидаза-положительными. Все штаммы не обладали протеолитической активностью (не продуцировали коллагеназу и казе-

иназу), не гидролизировали крахмал и не продуцировали лецитиназу. При росте в МПБ культуры не образовывали сероводород и аммиак. У трех штаммов (1-05; 2-05; 1-04) обнаружена способность к росту на безазотистой среде Эшби, что может свидетельствовать о том, что культуры способны фиксировать молекулярный азот или являются олигонитрофилами. Также эти три культуры хорошо развивались на синтетической среде, т.е. были способны усваивать азот минеральных солей. Нитраты восстанавливали штаммы 2-05, 1-04 и 3-04.

Штаммы не развивались при температуре +42 °С, при температуре +5 °С способность к росту была обнаружена только у штамма 3-04. Все изоляты хорошо росли в МПБ с 2,5% NaCl. Наиболее солетолерантным оказался штамм 3-04, у которого зафиксирован рост в присутствии 6,5% NaCl. При более высоких концентрациях NaCl (15; 20%) у всех культур рост отсутствовал.

Культуры, выделенные из гексадекана, проявили различную чувствительность к антибиотикам. Из антибиотиков группы *пенициллинов* наибольший эффект по отношению к исследуемым штаммам показал пиперациллин. Культура 3-04 характеризовалась высокой степенью чувствительности к оксациллину. Исследуемые штаммы проявили чувствительность к *карбапенемам*: имипенему и меропенему, при этом культура 3-04 оказалась высоко чувствительной. *Цефалоспорины* оказали различное воздействие на рост исследуемых микроорганизмов. Штаммы 1-04 и 1-05 проявили резистентность к цефалотину, цефазолину, при этом культура 1-05 также оказалась устойчивой к цефепиму, цефамандолу и цефуроксиму. Наиболее чувствительным к цефалоспоридам оказался штамм 3-04. Зоны подавления роста культуры от 28,5 до 30 мм были зарегистрированы в опытах с такими антибиотиками, как цефалотин, цефалексин, цефтриаксон, цефутоксим, цефазолин и цефаклором. К *ванкомицину* из четырех исследуемых изолятов слабую чувствительность проявил штамм 1-04. *Полимиксин* оказал бактерицидное действие на штаммы 1-04, 1-05, 2-05, в то время как 3-04 проявил резистентность к этому антибиотику. При действии *аминогликозидов* (гентамицина, канамицина, тобрамицина) на тест-культуры отмечались бактерицидный и бактериостатический эффект. Наиболее чувствительным к аминогликозидам оказался штамм 3-04.

Для характеристики штаммов, выделяемых из природных источников, важным является изучение их субстратной специфичности.

В связи с этим было исследована способность бактериальных штаммов, выделенных из гексадекана, использовать в качестве источников углерода индивидуальные углеводороды. Культуры 1-05, 2-05, 1-04 активно использовали *гексан*, *октан*, *изооктан*, *декан*, *ундекан*, *додекан*. На среде с углеродом четыреххлористым отмечался скудный рост у штаммов 1-05, 2-05, 1-04.

Что касается ароматических углеводородов, наиболее токсичными для штаммов являлись *бензол*, *нитробензол* и *толуол*. На средах с этими углеводородами изоляты из гексадекана давали слабый или скудный рост. Штамм 1-05 не развивался на средах с бензолом и толуолом. Культуры хорошо развивались на среде с *изопропилбензолом* и *ксилолом*. Однако на среде с изопропилбензолом рост наблюдался только до середины штриха, что свидетельствует о токсичности углеводорода, степень которой уменьшалась по мере снижения концентрации, делая возможным развитие штаммов.

Проведенные исследования показали, что углеводородоксиляющая активность трех изолятов из гексадекана в целом сходна с таковой эталонного штамма *P. aeruginosa*, входящего в состав «Деворойла».

Штаммы 1-05, 2-05, 1-04 хорошо развивались на средах с такими спиртами, как *этанол, октанол, глицерин*.

На среде с бутанолом отмечался умеренный или хороший рост изолятов. Более слабо культуры использовали *пентанол*. На среде с *изопропиловым спиртом* у исследуемых бактерий отмечался скудный рост, в отличие от производственного штамма *P. aeruginosa*. Штамм 3-04 из всех взятых для эксперимента спиртов использовал только октанол. *Ионол* не использовала ни одна культура, в том числе *P. aeruginosa*.

Изоляты из гексадекана, в отличие от штамма *P. aeruginosa*, входящего в состав препарата «Деворойл», окисляли *формалин*, при этом наибольшую активность проявила культура 2-05.

Также у исследуемых штаммов обнаружена способность развиваться на среде, содержащей *карболовую кислоту* в качестве единственного источника углерода. Более активно культуры росли на среде с 10% -й карболовой кислотой. Культуры 1-04, 1-05 и 2-05 хорошо развивались на таких субстратах, как *маргарин, сливочное масло, растительное масло, внутренний говяжий жир, пчелиный воск*. Штамм 3-04 проявил меньшую активность по отношению к этим источникам углерода.

Таким образом, исследования показали, что три культуры, выделенные из гексадекана, отличались способностью использовать широкий круг органических соединений. Важной характеристикой штаммов является их активность по отношению к различным углеводородам, а также жирам, и возможности их использовать в качестве единственного источника углерода. Все это позволяет говорить о перспективности использования выделенных культур микроорганизмов для устранения нефтезагрязнений¹.

Список использованной литературы

1. Жуков Д.В. Механизмы деградации углеводородов нефти микроорганизмами / Д.В. Жуков, В.П. Мурыгина, С.В. Калюжный // Успехи современной биологии. — 2006. — Т. 126, № 3. С. 285–296.
2. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук; под ред. А.И. Нетрусова. — М.: Академия, 2005. — 604 с.
3. Сидоров Д.Г. Полевой эксперимент по очистке почв от нефтяного загрязнения с использованием углеводородоксиляющих микроорганизмов / Д.Г. Сидоров, И.А. Борзенков, Р.Р. Ибатулин и др. // Прикладная биохимия и микробиология. — 1997. — Т. 33, № 5. — С. 497–502.
4. Хомякова Д.В. Состав углеводородоксиляющих микроорганизмов нефтезагрязненных почв Усинского района Республики Коми: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Д.В. Хомякова. — М., 2003.

Bibliography (transliterated)

1. Zhukov D.V. Mekhanizmy degradatsii uglevodorodov nefi mikroorganizmami / D.V. Zhukov, V.P. Murygina, S.V. Kalyuzhnyi // Uspekhi sovremennoi biologii. — 2006. — T. 126, № 3. S. 285–296.
2. Netrusov A.I. Praktikum po mikrobiologii / A.I. Netrusov, M.A. Egorova, L.M. Zakharchuk; pod red. A.I. Netrusova. — M.: Akademiya, 2005. — 604 s.

¹ Авторы признательны И.А. Борзенкову за предоставление культуры *Pseudomonas aeruginosa*.

3. Sidorov D.G. Polevoi eksperiment po ochistke pochv ot neftyanogo zagryazneniya s ispol'zovaniem uglevodorodokislyayushchikh mikroorganizmov / D.G. Sidorov, I.A. Borzenkov, R.R. Ibatulin i dr. // Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. — 1997. — T. 33, № 5. — S. 497–502.

4. Khomyakova D.V. Sostav uglevodorodokislyayushchikh mikroorganizmov neftezagryaznennykh pochv Usinskogo raiona Respubliki Komi: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk / D.V. Khomyakova. — M., 2003.

Информация об авторах

Вятчина Ольга Федоровна — кандидат биологических наук, доцент Иркутского государственного университета, г. Иркутск.

Горбачевская Ольга Петровна — аспирант Восточно-Сибирской государственной академии образования, г. Иркутск.

Стом Дэвард Иосифович — доктор биологических наук, профессор Иркутского государственного университета, г. Иркутск, e-mail: stomd@mail.ru.

Беломестнова Анна Игоревна — студент Иркутского государственного университета, г. Иркутск.

Authors

Vyatchina Olga Fyodorovna — PhD in Biological Sciences, Associate Professor, Irkutsk State University, Irkutsk.

Gorbachevskaya Olga Petrovna — post-graduate student, East Siberian State Academy of Education, Irkutsk.

Stom Daevard Iosifovich — Doctor of Biological Sciences, Professor, Irkutsk State University, Irkutsk, e-mail: stomd@mail.ru.

Belomestnova Anna Igorevna — student, Irkutsk State University, Irkutsk.