

УДК 579.22

ББК 20.18

О.Ф. Вятчина

кандидат биологических наук, доцент
Иркутского государственного университета,
г. Иркутск

О.П. Горбачевская
аспирантка Восточно-Сибирской
государственной академии образования
г. Иркутск

Д.И. Стом

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

А.И. Беломестнова

студентка Иркутского
государственного университета, г. Иркутск

ХАРАКТЕРИСТИКИ ШТАММОВ АЛКАНОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ УДАЛЕНИЯ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕНИЙ

Аннотация. Исследовали 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. Vyatcina

Cand. biol.sci., senior lecturer of
Irkutsk state university, Irkutsk

D.I. Stom

Doctor of Biological Sciences, professor of
Irkutsk state university, Irkutsk

O.P. Gorbachevskaya

post-graduate student of East Siberian state

Academy of education, Irkutsk

e-mail: stomd@mail.ru

A.I. Belomestnova

student of Irkutsk state university, Irkutsk

THE CHARACTERISTICS OF ALKANE-FEEDING STRAINS OF MICROORGANISMS WHICH ARE PERSPECTIVE FOR DISPOSAL OF OIL POLLUTION

Annotation. The substrate specificity of bacterial strains isolated from hexadecane keeping was investigated. It is established that isolats have ability to growth on wide circle of organic compounds among them oil products and lipids

Key words: alkane-feeding microorganisms, oil 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» (3). Препарат разработан в институте Микробиологии РАН и Научно-производственном предприятии «Биотехинвест».

Для выделения культур из цетана использовали метод глубинного посева в агаризованную синтетическую среду №1 следующего состава (в %): 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 %-ного спиртового раствора на 1 л среды (Нетрусов, 2005).

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 (Нетрусов, 2005). Особенности роста каждого штамма изучали по шкале, разработанной Хомяковой Д.В. (Хомякова, 2003). 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 °С 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 (Нетрусов, 2005). 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 счёт арабинозы, рамнозы, инозита, но не использовали сахарозу и сорбит. На глюкозе росли штаммы 1-05 и 2-05, лактозе 2-05, мальтозе-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 попарно 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 казеиназу), не гидролизovali 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 °C, при температуре +5 °C 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 цефипиму, цефамандолу и цефуроксиму. Наиболее чувствительным к цефалоспорином 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, цефуроксим, 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*, *изоактан*, *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 углеводородокисляющая 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 т.ч. *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%-ной 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 нефтезагрязнений. Авторы признательны И.А. Борзенкову за предоставление культуры *Pseudomonas aeruginosa*.

Работа выполнена при поддержке совместного российско-китайского гранта РФФИ № 06-04-39003 ГФЕНа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жуков Д.В., Мурыгина В.П., Калюжный С.В. Механизмы деградации углеводов нефти микроорганизмами // Успехи современной биологии. 2006. Т.126. №3. С.285-296.

2. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии // Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия, 2005. – 604 с.

3. Сидоров Д.Г., Борзенков И.А., Ибатулин Р.Р. и др. Полевой эксперимент по очистке почв от нефтяного загрязнения с использованием углеводородокисляющих микроорганизмов // Прикладная биохимия и микробиология. – 1997. – Т.33. – №5. – С. 497-502 Препарат разработан в институте Микробиологии РАН и Научно-производственном предприятии «Биотехинвест».

4. Хомякова Д.В. Состав углеводородокисляющих микроорганизмов нефтезагрязнённых почв Усинского района Республики Коми / Автореф. дис. канд. биол. наук. - Москва, 2003.