

Т.М. Ногина, Т.У. Думанская, А.Г. Кистень, В.С. Подгорский

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина*

СПОСОБНОСТЬ АКТИНОБАКТЕРИЙ К УСВОЕНИЮ Н-АЛКАНОВ В МИКРОАЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ

Установлено, что углеводородокисляющие штаммы актинобактерий – компоненты препарата «Эколан-М» способны к усвоению н-алканов в процессе микроаэробного культивирования в условиях нитратредукции. За 7 суток роста в этих условиях уровень деструкции н-гексадекана исследованными штаммами составил 52,0 %, что в 1,5 раза меньше, чем за такой же период при аэробном культивировании. Усвоенный клетками н-гексадекан полностью минерализовался до углекислого газа, количество которого в газовой фазе достигло 1,6 % на 9 сутки роста.

Ключевые слова: актинобактерии, н-алканы, нитратредукция, микроаэробные условия.

Нефтяные углеводороды относятся к наиболее распространенным загрязнителям окружающей среды [11, 14, 16]. Процесс аэробного окисления этих веществ микроорганизмами в природных условиях, в частности грунтовых водах и донных отложениях, обычно лимитируется низкой растворимостью кислорода в воде. Кроме того, неравномерное распределение водных потоков и питательных веществ создает в природных экосистемах подвижный спектр аэробных, микроаэробных и анаэробных условий существования микробных популяций [16]. Установлено, что углеводороды, включая н-алканы, могут использоваться как единственные источники углерода и энергии в отсутствие кислорода или его микроаэробного уровня представителями различных групп микроорганизмов, растущих в условиях нитрат-, сульфат- или хлоратредукции [1, 16, 18, 20]. Следует отметить, что низкая энергоемкость процесса нитратредукции, а также широкое использование нитратов в качестве основного источника азота в биотехнологиях очистки окружающей среды от углеводородов нефти и высокая растворимость в воде (92,1 г/100 мл воды при 25° С) делают его идеальным терминальным акцептором электронов в условиях нефтяных загрязнений [18]. Наличие одновременно нитратов и низкого уровня кислорода приводит к окислению стабильных групп углеводородов и позволяет интермедиатам этого окисления разрушаться путем денитрификации [1].

В литературе приведены лишь единичные сведения о способности актинобактерий, которые широко распространены в нефтезагрязненных экосистемах, окислять углеводороды в микроаэробных или анаэробных нитратредуцирующих условиях. Наиболее хорошо изучены в этом отношении представители аэробных денитрифицирующих грамотрицательных бактерий, принадлежащих к роду *Pseudomonas* [1, 16, 18]. Известно, что актинобактерии, в частности, виды *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus* имеют строго дыхательный тип метаболизма и многие обладают способностью к восстановлению нитратов в нитриты [8]. Вместе с тем, установлено, что в условиях нефтяных месторождений актинобактерии могут развиваться в углеводородном слое как при низком парциальном давлении кислорода в газовой фазе (в 10 – 25 раз ниже атмосферного давления кислорода воздуха), так и при его отсутствии [8]. Выявлена способность представителей рода *Rhodococcus* в микроаэробных условиях (при содержании кислорода в среде 1 мг/л) усваивать ацетат [8]. Имеются данные о том, что в условиях нитратредукции при анаэробном культивировании некоторые представители этих микроорганизмов, в частности, штамм *Rhodococcus ruber* Z25 разлагает жидкие парафины и сырую нефть [21], а нефтеокисляющий штамм *Dietzia* sp. A14101 не использует углеводороды, но активно усваивает жирные кислоты [15].

Высокий углеводородокисляющий потенциал актинобактерий и устойчивость к неблагоприятным факторам среды определяет их широкое применение для биоремедиации нефтезагрязненных экосистем. При этом наибольшую эффективность проявляют биопрепараты, включающие иммобилизованные на нефтепоглощающих сорбентах клетки актинобактерий, которые вносятся в загрязненную среду одновременно с содержащими нитраты азотно-фос-

© Т.М. Ногина, Т.У. Думанская, А.Г. Кистень, В.С. Подгорский, 2013

форными удобрениями, в частности, нитроаммофоской [6, 14, 19]. При очистке водных объектов эти препараты вместе с сорбированной нефтью могут оседать на дно водоемов, где ее дальнейшая деструкция может быть ограничена или вообще прекращена из-за недостатка кислорода. В таких условиях интенсификация процессов биоремедиации загрязненной нефтью воды и почвы может быть достигнута путем использования способных к денитрификации чистых культур или сообществ углеводородоокисляющих микроорганизмов [11, 18].

Учитывая приведенные данные, целью работы было определить способность актинобактерий – компонентов нефтеокисляющего препарата «Эколан-М» к усвоению углеводов в присутствии нитратов в микроаэробных условиях.

Материалы и методы. Объектами исследований были штаммы актинобактерий *Rhodococcus erythropolis* ИМВ В-7012 и ИМВ В-7277, *Dietzia maris* ИМВ В-7278 и *Gordonia rubripertincta* ИМВ Ас-5005, входящие в состав препарата «Эколан-М» и депонированные в Депозитории Института микробиологии и вирусологии НАН Украины.

Способность к нитратредукции у монокультур и смешанной (в соотношении 1:1:1) культуры этих бактерий определяли качественными реакциями, используя общепринятые методы [12]. В одном из них культивирование штаммов проводили на среде МПБ с 0,2 % KNO_3 , а в другом – вместо стандартной полужидкой среды [12] была использована минеральная среда 1 (г/л): NaNO_3 – 3,6 г/л, NH_4Cl – 6,48, KH_2PO_4 – 0,28, Na_2HPO_4 – 1,2, NaCl – 2,0, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2, $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,019, CaCl_2 – 0,011, н-гексадекан – 0,5 %. Количество содержащихся в среде нитратной и аммонийной форм азота соответствует рекомендованным в литературе [1, 16] для исследования процессов метаболизма н-гексадекана в условиях микроаэробной или анаэробной нитратредукции. В данном опыте в среду 1 дополнительно вносили 1,0 % агара.

Изучение способности исследованных штаммов усваивать н-гексадекан при росте на жидких минеральных средах в микроаэробных нитратредуцирующих условиях проводили при их совместном культивировании на среде 1 во флаконах объемом 500 мл, содержащих 100 мл среды, на качалках (145 об/мин) при температуре 28° С в течение 9 суток. В качестве посевного материала использовали смесь культуральных жидкостей исследуемых штаммов, выращенных отдельно до середины экспоненциальной фазы роста на среде 2, содержащей (г/л): NH_4Cl – 4,0, KH_2PO_4 – 0,28, Na_2HPO_4 – 1,2, NaCl – 2,0, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2, $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,019, CaCl_2 – 0,011, н-гексадекан – 0,5 %. Количество инокулята составляло 10 % от объема среды.

Для создания микроаэробных условий флаконы с засеянной средой продували двумя литрами воздушно-газовой смеси (воздух-аргон). Согласно сертификату качества содержание кислорода в аргоне составляло не более 0,0007 об %. Состав смеси воздух-аргон был рассчитан таким образом, чтобы содержание кислорода в ней было в пределах 5 %. Флаконы после продувки немедленно закрывали стерильными резиновыми пробками, которые фиксировали металлическими колпачками.

Для сравнительной оценки процесса деструкции н-гексадекана в аэробных условиях культивирование штаммов проводили на среде 2 во флаконах, закрытых ватными пробками, в течение 7 суток. Условия культивирования, подготовка и количество посевного материала были идентичны тем, которые использовались при микроаэробном росте.

Перед культивированием и на протяжении всего эксперимента из флаконов, в которых были созданы микроаэробные условия, через каждые 24 часа проводили отбор проб газовой фазы для определения концентрации кислорода и углекислого газа, содержание которых исследовали по стандартным методикам [3] на газовом хроматографе марки ЛХМ-8МД. Температура колонок – 60 °С, испарителя – 75 °С и детектора теплопроводности – 60 °С. Газ-носитель – аргон, скорость подачи газа – 30 мл/мин. Содержание газов в смеси (в %) рассчитывали по площади пиков на хроматограммах. Перед каждым отбором проб газовой фазы для газохроматографического анализа флаконы охлаждали в лаборатории до температуры окружающего воздуха, затем уравнивали в них давление с атмосферным, дозаполняя аргонем с помощью описанных ранее устройства и метода [7]. Степень разрежения в каждом флаконе охарактеризовывали количеством (см^3) аргона (приведенным к нормальным условиям для газов), который был израсходован на его дозаполнение.

Остаточные углеводороды определяли на анализаторе нефтепродуктов АН-1 с предва-

рительной их экстракцией четыреххлористым углеродом [9]. Биомассу клеток измеряли по оптической плотности предварительно отмытой гексаном культуральной жидкости. Исследование содержания аммонийного азота в среде культивирования проводили по ДСТУ ISO 7150-1:2003 [5], нитратного азота – по ГОСТ 18826-73 [2] и нитритной формы азота – по ДСТУ ISO 6777:2003 [4].

Все опыты выполняли в трех повторностях, статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel 2003.

Результаты и их обсуждение. Определение качественными реакциями способности исследованных штаммов к восстановлению нитратов в нитриты показало, что все они при росте на МПБ с 0,2 % KNO_3 , проявляли от слабо положительной до четко выраженной положительной реакции. В полужидкой среде 1 все штаммы и их смешанная культура росли с образованием газа, что свидетельствует об их способности к усвоению н-гексадекана в условиях нитратредукции. Следует отметить, что указанная среда содержит нитратную и избыток аммонийной формы азота, который необходим для того, чтобы нитрат использовался только для дыхания, а не в конструктивном метаболизме, так как ассимиляционная нитратредуктаза полностью подавляется избыточным содержанием в среде аммония [1, 16, 17]. В наших исследованиях используемый другими авторами в подобных экспериментах нитрат калия [1,16] был заменен на эквимолярное по азоту (0,6 г/л нитратного азота) количество нитрата натрия. Это связано с тем, что, по данным литературы [10], катионы натрия являются активаторами, а катионы калия – ингибиторами оксигеназ, а именно алкангидроксилазы – фермента, который проводит первичное окисление углеводов в соответствующие спирты.

Контрольный газохроматографический анализ состава основных компонентов атмосферного воздуха показал, что он содержит 21,0 % кислорода и 78,0 % азота. Результаты исследования состава газовой фазы во флаконах перед началом совместного культивирования актинобактерий в микроаэробных условиях свидетельствуют о том, что количество кислорода в ней было в 4,0–4,4 раза меньше его содержания в воздухе (таблица)

Таблица

Состав основных компонентов воздуха и газовой смеси для культивирования актинобактерий в микроаэробных условиях

Компоненты	Содержание в атмосферном воздухе ¹ , %	Начальное содержание в газовой фазе флаконов, %
Кислород	20,95	5,0 ± 0,2
Азот	78,08	19,0 ± 1,2
Аргон	0,93	75,8 ± 4,3
Углекислый газ	0,03	н.о
Другие газы	0,01	н.и

Примечание: ¹ – приведено по [13]; н/о – не обнаружено; н/и – не исследовали.

Исследование динамики усвоения н-гексадекана в условиях аэробного культивирования показало, что снижение его содержания в среде коррелировало с накоплением биомассы культур (рис. 1). Наиболее активное усвоение н-гексадекана наблюдалось в первые 4 суток роста: его количество уменьшилось с начальных 5000 мг/л до 1400 мг/л, что составляло 72,0 % деструкции, при этом средняя скорость потребления н-гексадекана клетками была равна 900,0 мг/сут. В дальнейшем происходило значительное замедление роста культур и усвоения н-гексадекана – в конце культивирования (7 сутки) его количество в среде составило 1050 мг/л, что соответствовало общему уровню деструкции 79,0 % за весь период роста и средней скорости усвоения – 564,3 мг/сут.

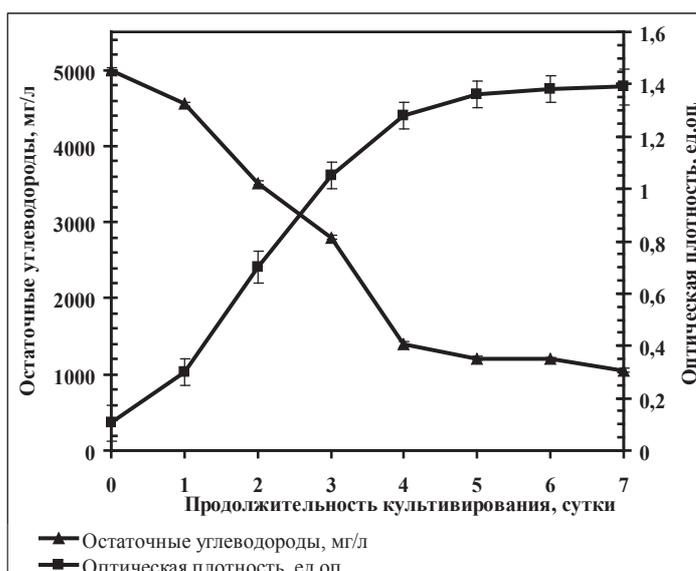


Рис. 1. Рост и усвоение штаммами н-гексадекана в аэробных условиях.

При росте в микроаэробных условиях (рис. 2) остаточное содержание н-гексадекана в среде к 7 суткам роста составило 2400 мг/л, что соответствовало 52,0 % деструкции, а средняя скорость его потребления за этот период была равна 371,4 мг/сутки, что в 1,5 раза меньше, чем при аэробном процессе. В конце культивирования (на 9 сутки) содержание н-гексадекана снизилось до 2280 мг/л, а уровень его деструкции достиг 54,4 %.

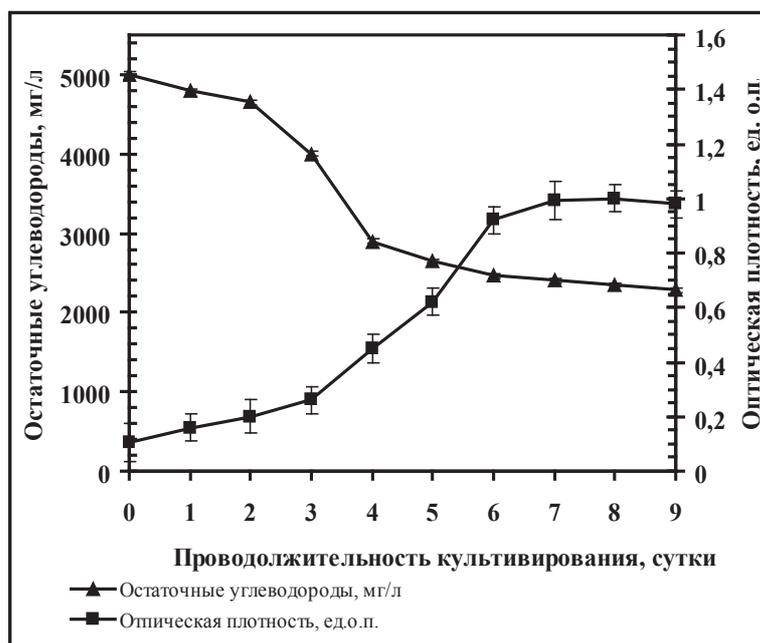


Рис. 2. Рост и усвоение штаммами н-гексадекана в микроаэробных условиях.

Контроль за процессом нитратредукции в микроаэробных условиях проводили путем исследования динамики изменения содержания в среде нитратного, нитритного и аммонийного азота. Установлено, что за 9 суток культивирования наблюдалось снижение количества аммонийного азота с 1,7 г/л до 1,2 г/л, а нитратного азота с начальных 0,6 г/л до 0,2 г/л, что в данных условиях свидетельствует о протекании процессов нитратредукции (рис. 3). Подтверждением этого факта может служить появление и накопление в среде как промежу-

точного продукта нитритного азота, количество которого коррелировало с уменьшением концентрации нитратного азота. На 9 сутки роста содержание нитритной формы азота достигло значения 0,03 мг/л, что в 3 раза меньше уровня, который вызывает полное ингибирование роста клеток в условиях нитратредукции, и не влияет на их физиологическую активность и жизнеспособность [16].

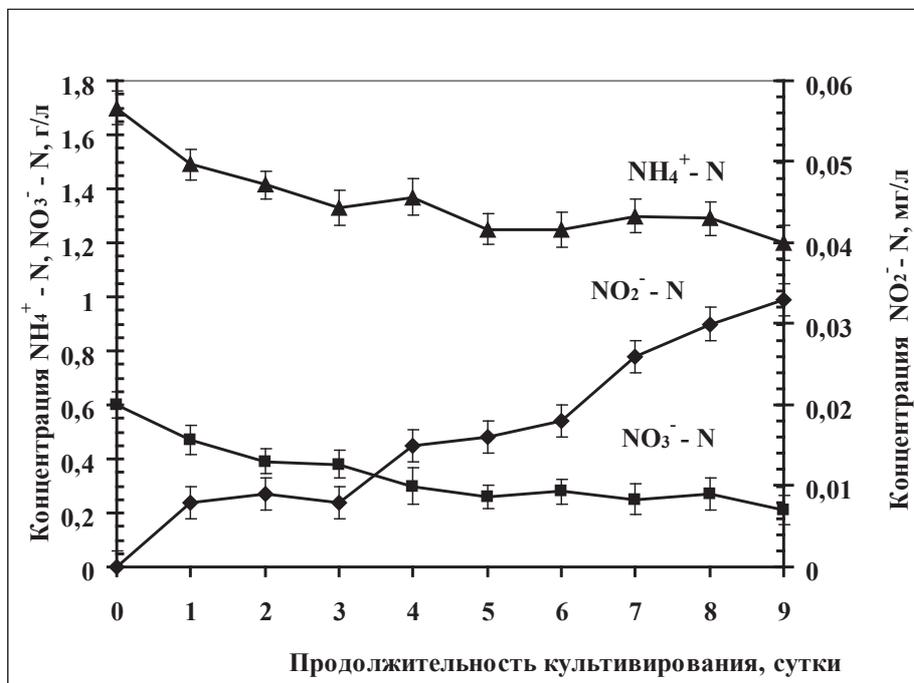


Рис. 3. Изменение содержания в среде аммонийного ($\text{NH}_4^+ - \text{N}$), нитратного ($\text{NO}_3^- - \text{N}$) и нитритного ($\text{NO}_2^- - \text{N}$) азота в процессе роста штаммов актинобактерий в микроаэробных условиях.

Определение состава газовой фазы во флаконах показало, что на 6-е сутки роста в микроаэробных условиях в ней отсутствовал кислород и появился углекислый газ, начальное содержание которого составило 0,5 % (рис. 4, 5, 6).

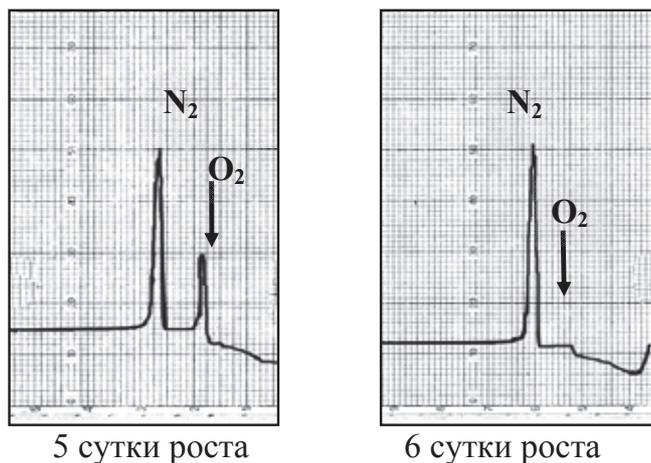


Рис. 4. Содержание азота (N_2) и кислорода (O_2) в газовой фазе в процессе культивирования штаммов актинобактерий в микроаэробных условиях.

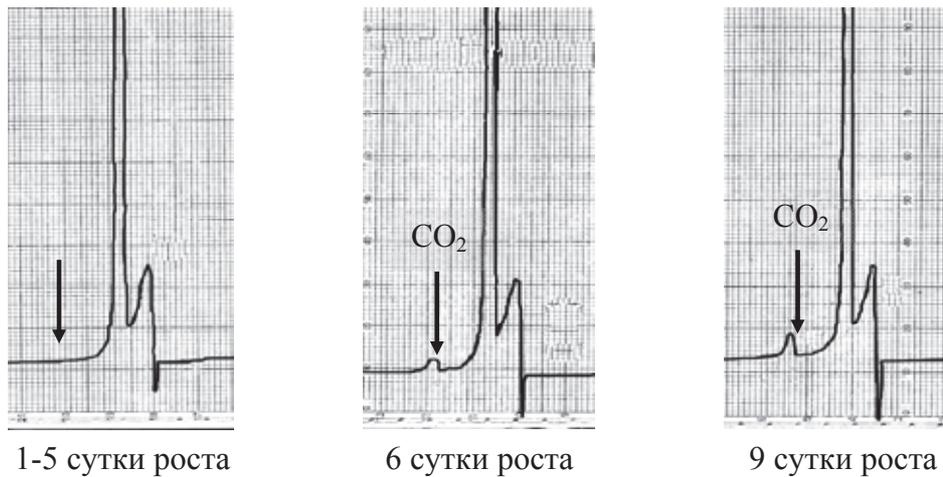


Рис. 5. Содержание углекислого газа (CO₂) в газовой фазе в процессе культивирования штаммов актинобактерий в микроаэробных условиях.

Анализ результатов определения степени разрежения во флаконах свидетельствует о том, что на протяжении первых 5 суток культивирования наблюдались незначительные изменения этого показателя (рис. 6). На 6 сутки роста было отмечено значительное увеличение разрежения во флаконах, на компенсацию которого было израсходовано 18 см³ аргона; достаточно высоким этот показатель был и на 7 сутки роста. Содержание, обнаруженного в газовой фазе углекислого газа, постепенно увеличивалось и к концу культивирования (9 сутки) составило 1,6 %. Этот факт свидетельствует о способности актинобактерий к минерализации усвоенного клетками n-гексадекана с образованием углекислого газа. Полное окисление n-алканов (в частности n-гексадекана) до углекислого газа и образование нитритов как промежуточных продуктов наблюдалось, также, при росте штамма HdN1 неидентифицированных денитрифицирующих бактерий в анаэробных условиях в присутствии нитратов [20].

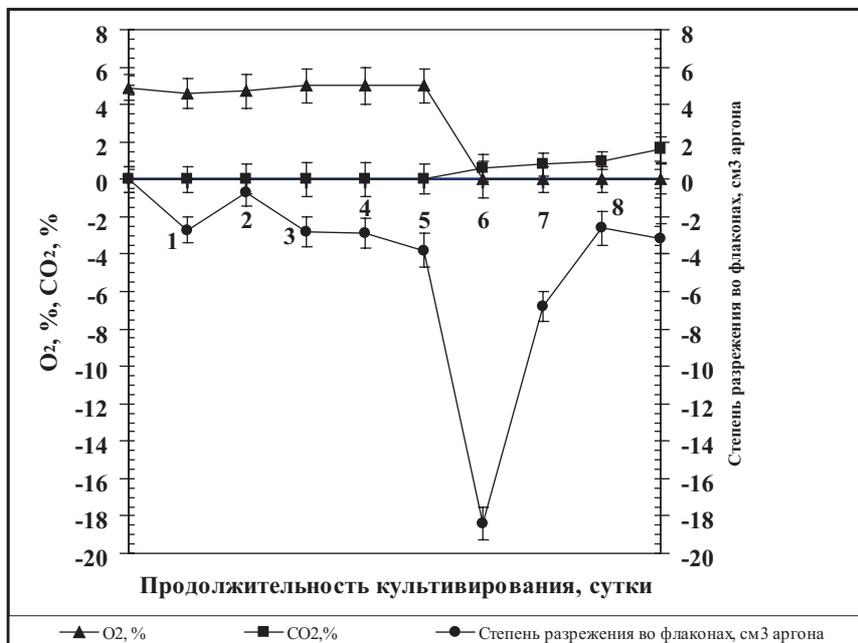


Рис. 6. Изменения содержания кислорода (O₂), углекислого газа (CO₂) и степени разрежения в газовой фазе флаконов при культивировании штаммов актинобактерий в микроаэробных условиях.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами установлено, что углеводородоокисляющие штаммы актинобактерий – компоненты препарата «Эколан-М», способны усваивать n-алканы в присутствии нитратов в условиях ограниченного доступа молекулярного кислорода. Это имеет большое значение для интенсификации с использованием препарата процессов очистки водоемов и почв от нефтяных углеводородов, которые снижают поступление кислорода к микроорганизмам, что приводит к ингибированию их жизнедеятельности. Способность разлагать углеводороды в условиях нитратредукции является одним из способов адаптации актинобактерий к неблагоприятным условиям существования и дает им преимущества по сравнению с другими углеводородоокисляющими микроорганизмами в биоремедиации окружающей среды от нефтяных загрязнений.

Т.М. Ногіна, Т.У. Думанська, О.Г. Кистень, В.С. Підгорський

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

ЗДАТНІСТЬ АКТИНОБАКТЕРІЙ ДО ЗАСВОЄННЯ Н-АЛКАНІВ В МІКРОАЕРОБНИХ УМОВАХ

Резюме

Встановлено, що нафтоокиснювальні штами актинобактерій – компоненти препарату «Еколан-М» здатні до засвоєння n-алканів у процесі мікроаеробного культивування в умовах нітратредукції. За 7 діб росту в цих умовах рівень деструкції n-гексадекану дослідженими штамми дорівнював 52,0 %, що у 1,5 рази менше, ніж за такий же період при аеробному культивуванні. Засвоєний клітинами n-гексадекан повністю мінералізувався до вуглекислого газу, кількість якого в газовій фазі досягла значення 1,6 % на 9 добу росту.

Ключові слова: актинобактерії, n-алкани, нітратредукція, мікроаеробні умови.

T.M. Nogina, T.U. Dumanskaya, A.G.Kisten, V.S. Pidgorskyi

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

THE ABILITY OF ACTINOBACTERIA TO ASSIMILATE N-ALKANES UNDER NITRATE-REDUCING CONDITIONS

S u m m a r y

It has been established that the oil-oxidizing strains of actinobacteria – components of the preparation «Ekolan-M» are able to assimilate n-alkanes during microaerobic cultivation in nitrate-reducing conditions. After 7 days of growth in these conditions, the level of biodegradation of n-hexadecane of the investigated strains was 52.0 %, which is 1.5 times less than for the same period in the aerobic cultivation. n-Hexadecane utilized by cells was completely mineralized to carbon dioxide, the amount of which in the gas phase reached 1.6% on the 9th day of growth.

The paper is presented in Russian.

К e y w o r d s: actinobacteria, n-alkanes, nitrate-reducing conditions, microaerobic conditions.

T h e a u t h o r ' s a d r e s s: *Nogina T.M.* Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv MSP, D03680, Ukraine.

1. Ахундова Э.З., Атакишиева Я.Ю. Продукция ПАВ культурой *Pseudomonas aeruginosa* AJ233 в условиях денитрификации // Материалы Международной научной конференции: «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии», Минск-Раков, 1-2 июня, 2006 г. – С. 195–198.
2. ГОСТ 18826-73. ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР. Вода питьевая. Методы определения содержания нитратов. Государственный комитет СССР по стандартам.

3. Другов Ю.С., Березкин В.Г. Газохроматографический анализ. – М.: Химия, 1981. – 256 с.
4. ДСТУ ISO 6777:2003. НАЦІОНАЛЬНИЙ СТАНДАРТ УКРАЇНИ. Якість води. Визначення нітритів. Спектрометричний метод молекулярної абсорбції. (ISO 6777-1984, ITD). – Київ: Держспоживстандарт України, 2004.
5. ДСТУ ISO 7150-1:2003. НАЦІОНАЛЬНИЙ СТАНДАРТ УКРАЇНИ. Якість води. Визначення амонію. Частина 1. Ручний спектрометричний метод. (ISO 7150/1:1984, ITD). – Київ: Держспоживстандарт України, 2004.
6. Карасева Э.В., Самков А.А., Карасев С.Г., Сычев В.Ю. Препарат для микробиологической очистки нефтяных шламов и загрязнённого нефтепродуктами грунта: Патент на изобретение № 2317162 РФ. Приоритет от 02.05.06. – Оpubл. 20.02.2008. – Бюл. №5.
7. Курдич И.К., Кигель Н.Ф., Егоров О.В. Физиологическая активность метанотрофных бактерий при их взаимодействии с горными породами // Микробиол. журн. – 1991. – 53, № 1. – С. 92–98.
8. Нестеренко О.А., Квасников Е.И., Ногина Т.М. Нокардиоподобные и коринеподобные бактерии. – Киев: Наук. думка, 1985. – 133 с.
9. ОСТ 38.01378-85. Охрана природы. Гидросфера, определение нефтепродуктов в сточных водах методом инфракрасной спектрофотометрии. – М.: Изд-во стандартов, 1985. – 8 с.
10. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.О. Особливості окиснення алканів у *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 – продуцента поверхнево-активних речовин // Микробиол. журн. – 2009. – 71, № 4. – С. 9–14.
11. Рахимова Э.Р., Осипова Л.А., Зарипова С.К. Очистка почвы от нефтяного загрязнения с использованием денитрифицирующих углеводородокисляющих микроорганизмов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – 40, № 6. – С. 649–653.
12. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. – 3-е изд. перераб. и доп. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1995. – 224 с.
13. Суркова Г.В. Газовый состав атмосферы Земли и его изменения. – Современные глобальные изменения природной среды. В 2-х томах. Том 1. – М.: Научный мир, 2006. – С. 35–87.
14. Холоденко В. П., Чугунов В. А., Жиглецова С. К., Родин В. Б., Ермоленко З. М., Фомченков В. М., Ирхина И. А., Кобелев В. С., Волков В. Я. Разработка биотехнологических методов ликвидации нефтяных загрязнений окружающей среды // Рос. хим. журн. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). – 2001. – 65, № 5–6. – С. 135–141.
15. Bødtker G., Torsvik T., Hvidsten I.V., Barth T. Hydrocarbon degradation by *Dietzia* sp. A14101 isolated from an oil reservoir model column // Antonie van Leeuwenhoek. – 2009. – 96, N 4. – С. 459–469.
16. Chayabutra C., Ju L.K. Degradation of n-hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and anaerobic denitrifying conditions // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – 66, N 2. – P. 493–498.
17. Knowles R. Denitrification // Microbiol. Rev. – 1982. – 46. – P.43–70.
18. Mbadinga S. M., Wang L.Y., Zhou L., Liu J.F., Gu J.D., Mu B.Z. Microbial communities involved in anaerobic degradation of alkanes // International Biodeterioration and Biodegradation. – 2011. – 65, N 1. – P. 1–13.
19. Samsonova A., Aleschenkova Z.M., Syomochkina N.F. Microbial preparation Rhodobel for decontamination of soil polluted with oil and derived products // Biotechnology and the Environment including Biogeotechnology. – New York: Nova Science Publishers, Inc., 2004. – 1. – P. 113–119.
20. Zedelius J., Rabus R., Grundmann O., Werner I., Brodkorb D., Schreiber F., Ehrenreich P., Behrends A., Wilkes H., Kube M., Reinhardt R., Widdel F. Alkane degradation under anoxic conditions by a nitrate-reducing bacterium with possible involvement of the electron acceptor in substrate activation // Environmental Microbiology Reports. – 2011. – 3, N 1. – P. 125–135.
21. Zheng C., Yu L., Huang L., Xiu J., Huang Z. Investigation of a hydrocarbon-degrading strain, *Rhodococcus ruber* Z25, for the potential of microbial enhanced oil recovery // J. Pet. Sci. Eng. – 2012. – 81. – P. 49–56.

Отримано 27.11.2012