



УДК 579.6 + 579.26

Некоторые особенности алканотрофных бактерий, выделенных из гексадекана

О. Ф. Вятчина, О. П. Горбачевская

Иркутский государственный университет, НИИ биологии при ИГУ
E-mail: stomd@mail.ru

Аннотация. Изучены морфолого-культуральные и физиолого-биохимические признаки штаммов алканотрофных бактерий, выделенных из гексадекана. Изоляты обладали способностью использовать в качестве источника углерода нефть и нефтепродукты, а также широкий спектр органических соединений.

Ключевые слова: алканотрофные бактерии, гексадекан, углеводородокисляющая активность.

Загрязнение почвы нефтью и нефтепродуктами на территориях с активной нефтепромысловой деятельностью приводит к нарушению экологического равновесия и существенному изменению сложившихся биоценозов. Высокие степени загрязнения, как локальные, так и обширные, приводят к гибели растений, животных и микроорганизмов [3].

В настоящее время для борьбы с последствиями загрязнения окружающей среды углеводородами нефти наиболее перспективным считается микробиологический метод. В связи с этим актуальной проблемой является поиск углеводородокисляющих микроорганизмов, обладающих высоким биотехнологическим потенциалом.

Целью данной работы явилось изучение морфолого-культуральных, физиолого-биохимических свойств штаммов бактерий, выделенных из гексадекана, а также оценка их углеводородокисляющей активности.

Материал и методы

Объектом исследований явились четыре бактериальных штамма, выделенные из гексадекана (1–04; 1–05; 2–05; 3–04) и штамм *Pseudomonas aeruginosa*, входящий в состав нефтеразрушающего препарата «Деворойл».

Для выделения культур из гексадекана использовали синтетическую среду (№ 1) следующего состава (%): KNO_3 – 0,40; MgSO_4 – 0,08; KH_2PO_4 – 0,06; Na_2HPO_4 – 0,14; агар-агар – 2; водопроводная вода; pH 7,2 [2]. После стерилизации в среду вносили 1 % (по объему) стерильного гексадекана в качестве единственного источника углерода.

Морфологические свойства изолятов изучали на живых и фиксированных окрашенных препаратах с использованием светового микроскопа. Характер роста культур определяли на среде № 1, рыбо-пептонном агаре (РПА), мясо-пептонном бульоне (МПБ). Изучение физиолого-биохимических признаков проводили, руководствуясь методами, изложенными в определителе Берджи [1].

Спектр углеводного питания штаммов оценивали при помощи метода «лунок» [2]. В качестве источников углерода использовали нефть Марковского месторождения Иркутской области, бензин автомобильный АИ-92, топочный мазут, дизельное топливо (летний и зимний сорт), базовое масло, реактивное топливо, гексадекан, вазелиновое масло, формалин (10; 20 %), карболовую кислоту (10; 20 %), маргарин «Столовый» (ОАО «Новосибирский жиркомбинат»), сливочное масло «Крестьянское» (ООО «Сибмаслопродукт»), растительное масло «Злато» (ООО «Лабинский МЭЗ»), внутренний говяжий жир, пчелиный воск.

Титр на средах с различными концентрациями нефтепродуктов определяли после двадцати четырех часов инкубирования культуры на круговой качалке (180 об/мин.) при температуре 25 °С, используя метод серийных разведений с последующим высевом на РПА [2].

Для статистической обработки применяли пакет программ Statistica 5.0. В таблицах и на рисунках представлены среднеарифметические величины и доверительный интервал при вероятности безошибочного прогноза $P \geq 0,95$. Выводы, полученные при сопоставлении результатов, также сделаны при $P \geq 0,95$.

Результаты и обсуждение

Выделенные из гексадекана бактериальные штаммы (1–04; 1–05; 2–05; 3–04) представлены грамтрицательными неспорообразующими подвижными палочками, одиночными или попарно соединенными. Штамм 3–04 отличался более крупными размерами клеток ($2,83 \pm 0,18 \times 0,89 \pm 0,06$ мкм). Размеры клеток культур 1–05, 2–05, 1–04 достоверно не отличались при уровне вероятности 0,95. Длина клеток составляла от 1,73 до 1,98, ширина – от 0,91 до 1,02 мкм.

Изучаемые штаммы хорошо росли как на синтетической среде (среда № 1), в которой единственным источником углерода являлся гексадекан, так и на белковых средах (РПА, МПБ). На синтетической среде штаммы образовывали колонии округлой формы, с ровным краем, гладкой поверхностью, белого, молочно-белого, голубовато-белого, грязновато-белого цвета. На скошенном РПА рост обильный с гладкой или шероховатой поверхностью, грязновато-белого или желтовато-белого цвета. При росте в МПБ для всех культур характерно образование осадка, отсутствие пленки, на 5-е сутки отмечалось появление пристеночного кольца.

Исследование спектра углеводного питания показало, что все штаммы, изолированные из гексадекана, не использовали глюкозу, сахарозу, лактозу, мальтозу. Арабинозу окисляли культуры 1–04, 1–05, 2–05. Штаммы не продуцировали ацетилметилкарбинол, не обладали протеолитической, амилолитической, лецитиназной активностями, не образовывали пигмент ни на одной из исследуемых сред. Оксидаза- и каталаза положительны. У трех изолятов (1–04, 1–05, 2–05) обнаружен рост на синтетической среде, что свидетельствует о способности усваивать азот минеральных солей. Также эти культуры хорошо росли на среде Эшби, что характерно для олигонитрофилов и микроорганизмов, фиксирующих молекулярный азот. Штаммы 1–04, 2–05, 3–04 восстанавливали нитраты (табл. 1).

Выделенные из гексадекана бактерии не развивались при температуре +42 °С, при +5 °С рост наблюдался только у штамма 3–04. Исследуемые микроорганизмы хорошо росли в МПБ с 2,5 % NaCl. Наиболее солетолерантным оказался штамм 3–04, у которого зафиксирован рост в присутствии 6,5% NaCl (табл. 1).

Таблица 1

Физиолого-биохимические признаки исследуемых штаммов

Тестируемый признак	1–04	1–05	2–05	3–04
Использование арабинозы	+	+	+	–
Использование сахарозы	–	–	–	–
Использование лактозы	–	–	–	–
Использование мальтозы	–	–	–	–
Окисление глюкозы	аэробное	–	–	–
	анаэробное	–	–	–
Образование ацетилметилкарбинола	–	–	–	–
Оксидазная активность	+	+	+	+
Каталазная активность	+	+	+	+
Гидролиз желатины	–	–	–	–
Пептонизация молока	–	–	–	–
Гидролиз крахмала	–	–	–	–
Лецитиназная активность	–	–	–	–
Восстановление нитратов	+	–	+	+
Рост на синтетической среде	+	+	+	–
Рост на среде Эшби	+	+	+	–
Образование пигмента (среда Кинга В)	–	–	–	–
Рост при +42 °С	–	–	–	–
Рост при +5 °С	–	–	–	+
Рост в присутствии 2,5 % NaCl	+	+	+	+
Рост в присутствии 6,5 % NaCl	–	–	–	+
Рост в присутствии 15 % NaCl	–	–	–	–

Примечание: «+» – наличие реакции; «–» – отсутствие реакции

Оценка углеводородокисляющей активности изолятов показала, что повышенной способностью развиваться на нефтепродуктах обладали три культуры (1–04; 1–05; 2–05) (табл. 2).

В отличие от производственного штамма (*P. aeruginosa*) исследуемые культуры давали рост на плотной среде с мазутом и бензином. На зимнем дизельном топливе наиболее активно развивались штаммы 1–05 и 2–05. На реактивном топливе у культуры 1–05 отмечался умеренный рост, у 1–04, 2–05 и 3–04 – слабый рост. Все штаммы использовали базовое масло, вазелиновое масло – культуры 1–05 и 2–05. В меньшей степени изоляты из гексадекана были адаптированы к нефти (табл. 2).

Следует отметить, что у культур снижалась интенсивность использования гексадекана после текущих пересевов и содержания в лабораторных условиях на среде РПА. При проведении исследований наибольшей активностью по отношению к гексадекану обладал штамм 1–05 и 1–04 (табл. 2).

У выделенных из гексадекана культур выявлена способность к росту на карболовой кислоте и формалине (табл. 2).

Штаммы 1–04, 1–05 и 2–05 хорошо развивались на таких субстратах, как маргарин, сли-

вочное масло, растительное масло, внутренний говяжий жир, пчелиный воск. Культура 3–04 проявила меньшую активность по отношению к этим источникам углерода (табл. 2).

При культивировании исследуемого штамма в среде с базовым маслом наибольшая интенсивность роста наблюдалась при концентрации 1 %. При этом титр культуры составил $3,34 \pm 0,20 \times 10^8$ КОЕ/мл. Более высокие концентрации базового масла в среде приводили к снижению количества жизнеспособных клеток (табл. 3).

В среде с мазутом рост культуры был зафиксирован при содержании нефтепродукта 1; 5 и 10 % (табл. 3).

Таким образом, проведенные исследования показали, что штаммы, выделенные из гексадекана, обладали способностью использовать в качестве источника углерода нефть и нефтепродукты, а также широкий спектр органических соединений.

Благодарности

Авторы признательны И. А. Борзенкову за любезно предоставленный нефтеокисляющий штамм *P. aeruginosa*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ и ГФЕНа 06–04–39003.

Таблица 2

Рост исследуемых штаммов на средах с различными источниками углерода

Источник углерода	Культура				
	1–04	1–05	2–05	3–04	<i>P. aeruginosa</i>
Гексадекан	++++	++++	+++	+	++++
Нефть	+	++	+	+–	++++
Дизельное топливо зимнее	++	+++	+++	+	++
Мазут	++++	++++	++++	–	–
Бензин	+++	+	+++	+–	–
Реактивное топливо	+	++	+	+	++
Базовое масло	++	++	++	+	++
Вазелиновое масло	–	++++	+++	–	–
Формалин 10 %	+	+	++	+	–
Формалин 20 %	+	+	++	+	–
Формалин 30 %	–	+	++	+	–
Карболовая кислота 10 %	++	++	++	+	–
Карболовая кислота 20 %	+	+	++	–	–
Маргарин	++++	++++	++++	++	++++
Сливочное масло	++++	+++	++++	++	++++
Растительное масло	+++	+++	+++	+	++++
Внутренний говяжий жир	+++	++++	++++	+++	+++
Пчелиный воск	++++	++++	++++	+	–

Примечание: «++++» – обильный рост; «+++» – хороший рост; «++» – умеренный рост; «+ –» – скудный рост; «–» – отсутствие роста

Таблица 3

Рост штамма 1–05 на средах с нефтепродуктами

Нефтепродукт	Титр исследуемого штамма (КОЕ/мл) в средах с различными концентрациями нефтепродуктов				
	1 %	5 %	10 %	20 %	50 %
Гексадекан	1,39±0,38×10 ⁸	1,97±0,17×10 ⁸	1,73±0,23×10 ⁸	2,1±0,25×10 ⁸	1,99±0,10×10 ⁸
Дизельное топливо (летний сорт)	1,19±0,10×10 ⁸	0,83±0,16×10 ⁸	1,11±0,30×10 ⁸	0,94±0,18×10 ⁸	1,54±0,18×10 ⁸
Дизельное топливо (зимний сорт)	1,02±0,19×10 ⁸	0,90±0,02×10 ⁸	1,23±0,31×10 ⁸	1,11±0,25×10 ⁸	1,08±0,25×10 ⁸
Базовое масло	3,34±0,20×10 ⁸	0,89±0,10×10 ⁸	1,67±0,33×10 ⁸	1,87±0,18×10 ⁸	1,38±0,05×10 ⁸
Мазут	1,58±0,22×10 ⁸	1,86±0,25×10 ⁸	1,45±0,15×10 ⁸	НД	НД

Примечание: НД – нет данных

Литература

1. Определитель бактерий Берджи : в 2 т. : пер. с англ. / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. – М. : Мир, 1997. – 800 с.

2. Практикум по микробиологии : учеб. пособие для студ. вузов / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и др.; под ред. А. И. Нетрусова. М. : «Академия», 2005. – 608 с.

3. Фахрутдинов А. И. Результаты рекультивации нефтезагрязненных территорий с применением бактериального препарата / А. И. Фахрутдинов, В. Г. Алехин, Л. А. Малышкина // Наука и образование XXI века : сб. тез. докл. второй окружной конф. мол. ученых ХМАО. – Сургут : Изд-во СурГУ, 2001. – С. 55–56.

Some features of alkane consuming bacteria isolated from hexadecane

O. F. Vyatchina, O. P. Gorbachevskaya

Irkutsk State University

Abstract. Morphological and cultural and physiological and biochemical attributes of alkane consuming strains of bacteria isolated from hexadecane are studied. Isolates have ability to use oil and mineral oil and also a wide spectrum of organic substances as a source of carbon.

Key words: alkane consuming bacteria, hexadecane, carbohydrates degrading activity.

Вятчина Ольга Федоровна
Иркутский государственный университет,
664003 г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5,
кандидат биологических наук, доцент,
тел.(3952) 24–18–70, (факс) (3952) 24–18–55,
E-mail: stomd@mail.ru

Vyatchina Olga Fedorovna
Irkutsk State University
5, Sukhe-Batora St., Irkutsk, 664003
Ph.D. in Biology, ass. prof
Phone: (3952) 24–18–70, fax (3952) 24–18–55
E-mail: stomd@mail.ru