

**ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ И НИТРОГЕНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИИ
OCHROBACTERUM SP. ИБ ДТ-5.3/2**

©2013 Т.Ю. Коршунова, С.П. Четвериков, С.Р. Мухаматдырова, О.Н. Логинов

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 10.06.2013

Изучена способность штамма *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 к окислению нефти и ее фракций. Исследована азотфиксирующая активность бактерии и деградация углеводов различной природы в ходе этого процесса. Показано увеличение потенциальной нитрогеназной активности почвы после ее инокуляции микроорганизмами *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2.

Ключевые слова: *диазотрофы, нефтедеструкторы, штамм Ochrobactrum sp. ИБ ДТ-5.3/2, окислительная, нитрогеназная активность.*

Современные технологии нефтедобычи и транспортировки нефти и продуктов ее переработки приводят к значительному числу аварий, в результате которых в природные объекты попадает большое количество различных углеводов. Эти ксенобиотики оказывают отрицательное воздействие на все компоненты экосистемы и в настоящее время считаются основными загрязнителями окружающей среды [1]. Особую нагрузку при этом испытывает почва, что проявляется в замедлении процесса минерализации, нарушении баланса почвенных ферментов, уменьшении дыхательной активности и способности к самоочищению, а также в снижении жизнедеятельности организмов почвенного биоценоза [2-3]. Использование биологических средств ликвидации нефтяных загрязнений почвы часто является единственным возможным способом восстановления экологически чистой обстановки. Биodeградация нефти в окружающей среде начинается микроорганизмами, поэтому важно, чтобы их численность была высокой (особенно на начальном этапе восстановления экосистемы). Это не всегда возможно, поскольку микробиоценоз страдает от токсического шока, вызванного поступлением больших количеств нефти в случае разлива, и численность микроорганизмов сокращается. Внесение дополнительных количеств эффективных микроорганизмов-деструкторов, способных использовать широкий круг органических экотоксикантов в качестве единственного источника углерода и энергии, позволяет ускорить разрушение нефти [4-5].

Подверженность углеводов биоразложению зависит от их класса, концентрации в среде, разветвленности и длины углеродной цепочки, наличия в соединении галогенов, кислорода или других гетерогенных атомов. Кроме того, способность к окислению зависит от штамма микроорганизмов и условий их жизнедеятельности (аэрации, содержания CO₂ в воздухе и проч.). Степень деструкции углеводов коррелирует с увеличением численности и оксигеназной активности бактерий. Микробное окисление

углеводов нефти происходит через серию каталитических процессов с образованием промежуточных продуктов метаболизма – спиртов, альдегидов, кетонов, жирных и карбоновых кислот, которые в конечном итоге окисляются до углекислого газа.

На темпы биodeградации нефти и продуктов ее переработки влияет и обеспеченность алканотрофных бактерий микроэлементами, важнейшим среди которых является азот. При загрязнении почв нефтью вносится большое количество углерода, что приводит к резкому изменению соотношения C:N и установлению режима дефицита азота для углеводородоокисляющих микроорганизмов. Поэтому задачей биотехнологического подхода к восстановлению почв является активизация микробного метаболизма путем корректировки углеродно-азотного баланса [6]. Как правило, это достигается путем внесения больших доз минеральных азотных удобрений, которые составляют одну из основных статей расходов при обезвреживании большинства загрязненных объектов. Такой способ является не только бесполезным, но часто и вредным, потому, что значительные количества удобрений могут быть токсичным для микроорганизмов и тем более для растений [7].

В то же время, в природных экосистемах баланс биогенных элементов поддерживается за счет биологической азотфиксации. До 90% количества азота в почве связано с деятельностью diaзотрофных микроорганизмов. Поэтому внесение в загрязненную нефтью и нефтепродуктами почву полифункциональных штаммов бактерий, способных не только к деградации ксенобиотиков, но и к diaзотрофии, представляется очень эффективным способом биоремедиации. Так, например, свободноживущие азотфиксаторы рода *Ochrobactrum* разлагают различные химические соединения, могут образовывать клубеньки на корнях растений и обладают денитрифицирующей активностью [8-11].

Целью данной работы было исследование способности штамма *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 к окислению нефти, нефтепродуктов и органических соединений, а также к фиксации атмосферного азота, в т.ч. при пониженной температуре.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Окислительную активность штамма *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2, изолированного из серой лесной поч-

Коршунова Татьяна Юрьевна, к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: korshunovaty@mail.ru; Четвериков Сергей Павлович, д.б.н., ведущий научный сотрудник, e-mail: chekov@mail.ru; Мухаматдырова Светлана Ринатовна, аспирант, e-mail: svetrm@gmail.com; Логинов Олег Николаевич, д.б.н., проф., зав. лабораторией, e-mail: biolab316@yandex.ru

вы, загрязненной дизельным топливом [12] определяли по выделению углекислого газа. Для этого в среду Диановой-Ворошиловой [13] (250 мл) вносили 1% источника углерода и 5 мл трехсуточной культуры *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 с содержанием клеток $1,0 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. В герметично закрытые колбы подавали стерильный воздух (520 мл/мин), который после окисления субстрата улавливали поглотителем углекислого газа (200 мл 0,1н. гидроксида натрия). Из сосудов посуточно отбирали аликвоту в количестве 10 мл и титровали 0,1н. раствором соляной кислоты. Окислительную активность рассчитывали по количеству углекислого газа, оттитрованного кислотой. Длительность эксперимента составляла 3 сут.

Определение нитрогеназной активности бактерий проводили методом, основанным на восстановлении ацетилена [14]. Микроорганизмы культивировали на безазотистой среде Эшби (50 мл) [13] при оптимальной температуре роста 26°C и в условиях пониженной температуры (8°C). Для проверки влияния источника углерода на азотфиксирующую активность, маннит в среде Эшби в других вариантах опыта был последовательно заменен на декан (0,5%), толуол (1%) и β -метилнафталин (0,5%). Активность фермента нитрогеназы определяли после двух суток выращивания микроорганизмов на лабораторной термостатируемой установке при 180 об/мин. Ацетилен вводили в сосуды с *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 до концентрации 10% (по объему). Через 1,5 час отбирали шприцем пробы газа из каждой колбы в трехкратной повторности.

Содержание ацетилена и этилена выявляли на газовом хроматографе «Кристалл Люкс 4000» (Россия) с пламенным ионизационным детектором (длина колонки 3 м, сорбент - Рогарак Q) по времени выхода каждого газа, сравнивая его со временем выхода известного стандартного газа (азот). Объем вводимой газовой пробы 1 мл. Количество этилена и ацетилена рассчитывали по калибровочной кривой.

Титр бактериальных суспензий подсчитывали после двух суток культивирования на агаризованной питательной среде Раймонда [15] с 0,1% пептона. В качестве источника углерода на поверхность среды наносили 100 мкл стерильного дизельного топлива.

После отбора газовой пробы остаточное содержание декана и толуола определяли с помощью газовой хроматографии после экстракции гексаном, β -метилнафталина – гравиметрическим методом после экстракции хлороформом. Потенциальную активность азотфиксации в почве (чернозем выщелоченный) определяли по Умарову [16] с нашими модификациями. В почвенные образцы массой 200 г вносили по 10 мл бактериальной суспензии с титром 10^9 КОЕ/мл, увлажняли, тщательно перемешивали и убирали в термостат на 3 сут. Далее из каждого образца отбирали в пенициллиновые флаконы по 5 г почвы, добавляли по 2% (от массы абсолютно сухой почвы) источника углерода (маннит, декан, толуол и β -метилнафталин), увлажняли, перемешивали, герметично закупоривали резиновыми пробками (чтобы предотвратить улетучивание углеводородов). Часть проб помещали в термостат при 26°C, другую часть – в холодильник при 8°C. Через сутки во флаконы вводили по 0,5 мл аце-

тилена. Еще через один час инкубации в термостате и холодильнике отбирали газовую пробу (0,5 мл) для анализа на газовом хроматографе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Штамм *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/1 проявил высокую окислительную активность в отношении большинства использованных субстратов, за исключением парафина и церезина, что, скорее всего, объясняется нерастворимостью данных субстратов в воде (табл. 1). Постепенное возрастание способности к окислению в ряду n-алканов гептан-ундекан-додекан (77 – 94 – 116 мг CO₂/г субстрата) вполне закономерно и объясняется увеличением биодоступности углеводородов по мере удлинения углеродной цепи.

Таблица 1. Окислительная активность микроорганизмов *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2

Субстрат	Окислительная активность, мг CO ₂ /г субстрата
Гептан	77
Ундекан	94
Додекан	116
Циклогексан	99
Изопропанол	62
Гексадеканол	91
Фенол	36
Бензол	85
Толуол	93
o-Ксилол	76
Нафталин	88
Нефть	84
Дизельное топливо	60
Смазочное масло	99
Парафин	11
Церезин	14

От углеводородов с открытой цепью и циклоалканов ароматические углеводороды отличаются лучшей растворимостью в воде. Для их поступления в микробную клетку обязательно наличие гидрофобных внешних слоев. Они нарушают проницаемость мембран, блокируют действие ряда ферментов, т.е. представляют собой клеточные яды. Несмотря на высокую токсичность аренов и их производных, изучаемый штамм обладает значительной окислительной активностью по отношению к этим соединениям (76-93 мг CO₂/г субстрата), сопоставимой с таковой для предельных углеводородов. Нефть, смазочное масло, дизельное топливо также хорошо подвергаются микробиологическому окислению бактериями исследуемого штамма. Очевидно, что у микроорганизмов *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/1 имеется ферментная система оксидаз смешанных функций (оксигеназ), которые индуцируются продуктами последовательного окисления углеводородов: высшими жирными спиртами, альдегидами, кислотами. Оксигеназы осуществляют введение одного атома кислорода из его молекулярной формы в концевую метильную группу углеводорода, образуя при этом окисленные соединения. Это свойство является очень важным с практической точки зрения, т.к. благодаря ему бактерии *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/1 могут применяться в биотехнологии, например, в качестве основы биопрепарата для очист-

ки окружающей среды от нефти и нефтепродуктов.

Далее была изучена нитрогеназная активность *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/1 при различных температурах и источниках углерода, таких как маннит

(контроль), декан, толуол и β-метилнафталин, степень биодegradации этих углеводов и динамика численности микроорганизмов в процессе эксперимента (табл. 2).

Таблица 2. Численность микроорганизмов штамма *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/1, его нитрогеназная активность и степень биодegradации углеводов, используемых в качестве источника углерода при выращивании на среде Эшби при температуре 8°C и 25°C

Субстрат	Титр, КОЕ/мл		Нитрогеназная активность, мкг N ₂ /мл/ч		Биодegradация углеводов, %	
	8°C	26°C	8°C	26°C	8°C	26°C
Маннит	2,9 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁷	0,14	0,19	-	-
Декан	н/д	8,3 x 10 ⁶	н/д	0,06	н/д	88,60
Толуол	9,6 x 10 ⁶	3,0 x 10 ⁶	1,44	0,19	66,30	95,40
β-метилнафталин	3,0 x 10 ⁶	4,7 x 10 ⁶	0,24	0,02	18,50	25,00

Прим. Начальный титр бактериальной суспензии при 8°C – 3,3x10⁵ КОЕ/мл, при 25°C – 2,8x10⁵ КОЕ/мл; «н/д» – нет данных

Рост численности микроорганизмов составил один порядок как при комнатной, так и при пониженной температуре, за исключением варианта, когда бактерии культивировали на среде Эшби с маннитом при 26°C. В этом случае численность *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/1 увеличилась на два порядка.

При выращивании на среде с маннитом, нитрогеназная активность штамма при комнатной температуре (0,19 мкг N₂/мл/ч) незначительно увеличивалась по сравнению с таковой при низкой положительной температуре (0,14 мкг N₂/мл/ч). При использовании в качестве субстрата толуола способность к фиксации азота при 26°C осталась такой же, как в случае с маннитом (0,19 мкг N₂/мл/ч), а при 8°C – увеличилась до 1,44 мкг N₂/мл/ч. На среде с деканом и β-метилнафталином при комнатной температуре бактерии *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/1 проявляют очень низкую азотфиксирующую активность (0,06 и 0,02 мкг N₂/мл/ч, соответственно). При понижении темпе-

ратуры до 8°C этот показатель резко возрастает в 12 раз при применении β-метилнафталина как источника углерода и энергии. В целом, можно отметить, что при использовании в качестве субстратов углеводов нитрогеназная активность с понижением температуры возрастает. Возможно, это свидетельствует о наличии у *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/1 ванадий-содержащей нитрогеназы, способной к эффективной фиксации азота в условиях невысокой положительной температуры [17]. Происходящая в ходе азотфиксации бактериями деградация углеводородного субстрата, наоборот, увеличивалась с ростом температуры (табл. 2). Наиболее высокие показатели биодеструкции были достигнуты для толуола – 95, 40% при 26°C. Также достаточно полно разлагается при комнатных условиях и декан (88,60%). Эти значения хорошо соотносятся с данными по окислительной активности *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/1 в отношении как ароматических, так и предельных углеводов (табл. 1).

Таблица 3. Потенциальная нитрогеназная активность почвенных образцов с аборигенной микрофлорой и инокулированных бактериями *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/1 при температуре 8°C и 25°C

Источник углерода	Потенциальная нитрогеназная активность почвы, мг N ₂ /кг/ч			
	8°C		26°C	
	С аборигенными микроорганизмами	После инокуляции	С аборигенными микроорганизмами	После инокуляции
Маннит	1165	1303	990	2040
Декан	1016	2075	959	1852
Толуол	1074	2011	1173	5523
β-метилнафталин	950	2349	1646	2222

Потенциальная нитрогеназная активность почвенных проб с внесенными бактериями *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/1 как при 8°C, так и при 26°C была значительно выше, чем у контрольных образцов, содержащих только аборигенную микрофлору (табл. 3). Причем, при пониженной положительной температуре при использовании в качестве субстрата маннита, азотфиксирующая способность инокулированной почвы возрастала незначительно (в 1,12 раза), а при применении углеводов различной химической природы азотфиксация увеличивалась в 1,87-2,47 раза (толуол и β-метилнафталин, соответственно). При

26°C самое высокое значение потенциальной нитрогеназной активности в контроле было у образцов с β-метилнафталином (1646 мг N₂/кг/ч), которое при инокулировании почвы *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/1 возросло в 1,35 раза (2222 мг N₂/кг/ч). При комнатной температуре наивысший показатель потенциальной нитрогеназной активности наблюдался у почвы, загрязненной толуолом - 5523 мг N₂/кг/ч (в контроле – 1173 мг N₂/кг/ч, увеличение в 4,71 раза). В случае с маннитом и деканом потенциальная нитрогеназная активность была схожей как у почвы с аборигенной микрофлорой (990 и 959 N₂/кг/ч, соответственно), так

и у проб с внесенными бактериями (2040 и 1852 N₂/кг/ч, соответственно). То есть, азотфиксирующая активность при инокуляции увеличивалась практически одинаково – в 1,93 раза у почвы с деканом и 2,06 раза у почвы с маннитом.

Таким образом, ферментные системы изучаемого штамма способны к окислению органических соединений различной природы, а также к фиксации атмосферного азота. Бактерии *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/1 обладают высоким биотехнологическим потенциалом. Они проявили себя как активные нефтедеструкторы, разлагающие нефть и продукты ее переработки до конечных веществ – углекислого газа и воды. Одновременно с этим указанные микроорганизмы повышают плодородие очищаемой почвы, восполняя в ней недостаток важнейшего биогенного элемента – азота, в том числе при пониженной температуре.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eurosoil 2008: soil – society – environment / Eds W.H. Blum, M.H. Gerzabek, M. Vondra. Vienna: BOKU, 2008. 400 p.
2. Сулейманов Р.Р., Габбасова И.М., Ситдииков Р.Н. Изменение свойств нефтезагрязнённой серой лесной почвы в процессе биологической рекультивации // Известия РАН. Сер. биол. 2005. № 1. С 109-115.
3. Stroud J.L., Paton G.I., Semple K.T. Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation // J. Appl. Microbiol. 2007. V. 102. N 5. P. 1239-1253.
4. Нечаева И.А., Филонов А.Е., Ахметов Л.И. и др. Стимуляция микробной деструкции нефти в почве путем внесения бактериальной ассоциации и минерального удобрения в лабораторных и полевых условиях // Биотехнология. 2009. № 1. С. 64-70.
5. Ouyang W., Liu H., Murygina V. et al. Comparison of bioaugmentation and composting for remediation of oily sludge: A field-scale study in China // Process Biochem. 2005. V. 40. N 12. P. 3763-3768.
6. Aichberger H., Hasinger M., Braun R., Loibner A.P. Potential of preliminary test methods to predict biodegradation performance of petroleum hydrocarbons in soil // Biodegradation. 2005. V. 16. N 2. P. 115-125.
7. Chaîneau C.H., Yepremian C., Vidalie J.F. et al. Bioremediation of a crude oil-polluted soil: Biodegradation, leaching and toxicity assessments // Water, Air and Soil Pollution. 2003. V. 144. N 1. P. 419-440.
8. Ваккерев-Коузова Н.Д. Азотфиксирующая бактерия *Ochrobactrum intrmedium* ANKI, способная к трансформации азобензола // Прикладная биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 4. С. 450-454.
9. Favaloro B., Tamburro A., Trofino M.A. et al. Modulation of the glutathione S-transferase in *Ochrobactrum anthropi*: function of xenobiotic substrates and other forms of stress // Biochem. J. 2000. V. 346. N 2. P. 553-559.
10. Van Hamme J.D., Odumeru J.A., Ward O.P. Community dynamics of a mixed-bacterial culture growing on petroleum hydrocarbons in batch culture // Can. J. Microbiol. 2000. V. 46. N 5. P. 441-450.
11. Trujillo M.E., Willems A., Abril A. et al. Nodulation of *Lupinus* by strains of the new species *Ochrobactrum lupini* sp. nov. // Appl. Env. Microbiol. 2005. V. 71. N 3. P. 1318-1327.
12. Коришунова Т.Ю., Мухаматдырова С.Р., Логинов О.Н. Новый штамм бактерии рода *Ochrobactrum*: свойства и филогенетическое положение // Известия УНЦ РАН. 2013. № 2. С. 90-94.
13. Держинская И.С. Питательные среды для выделения и культивирования микроорганизмов. Астрахань: Изд-во АГТУ, 2008. 348 с.
14. Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1986. 136 с.
15. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // Develop. Industr. Microbiol. 1961. V. 2. N 1. P. 23-32.
16. Теннер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для вузов. М.: Дрофа, 2004. 256 с.
17. Bellenger J.P., Wichard T., Kraepiel A.M.L. Vanadium Requirements and Uptake Kinetics in the Dinitrogen-Fixing Bacterium *Azotobacter vinelandii* // Appl. Env. Microbiol. 2008. V. 74. N 5. P. 1478-1484.

OXIDIZING AND NITROGENASE ACTIVITY OF THE BACTERIUM *OCHROBACTRUM* SP. ИБ ДТ-5.3/2

©2013 Т.Ю. Korshunova, S.P. Chetverikov, S.R. Mukhamatdyarova, O.N. Loginov
Institute of Biology, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

Ability of the strain *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 to oxidation of oil and its fractions was studied. Nitrogen-fixing activity of the bacterium and degradation of hydrocarbons of the various nature were investigated during this process. The increase in potential nitrogenase activity of the soil with microorganisms *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 was shown.

Key words: nitrogen-fixing microorganisms, *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2, oxidizing, nitrogenase activity.

Tatyana Korshunova, Candidate of Biology, senior researcher, e-mail: korshunovaty@mail.ru; Sergey Chetverikov, Doctor of Biology, leading researcher, e-mail: che-kov@mail.ru; Svetlana Mukhamatdyarova, post-graduate student, e-mail: svetarm@gmail.com; Oleg Loginov, Doctor of Biology, professor, head of laboratory, e-mail: biolab316@yandex.ru