

## СВОЙСТВА И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ БАКТЕРИИ *ACINETOBACTER* SP. ИБ ДТ-5.1/1

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

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 10.06.2013

Изучены культурально-морфологические, физиолого-биохимические свойства и филогенетическое положение нового штамма *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1, выделенного из серой лесной почвы, загрязненной дизельным топливом. Показана способность бактерии к утилизации нефти, нефтяных углеводородов и других органических веществ различной природы.

**Ключевые слова:** штамм *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1, культуральные и физиолого-биохимические свойства, филогенетическое древо.

В настоящее время нефть и ее производные признаны главными загрязнителями окружающей среды. Это связано с тем, что нефть стала самым используемым источником энергии. Она относительно легко добывается, транспортируется и перерабатывается в широкую гамму продуктов различного назначения. Все технологические процессы в нефтяной промышленности (разведка, бурение, добыча, сбор, транспорт, хранение и переработка) нарушают естественную экологическую обстановку. Сама нефть, ее компоненты, нефтяной и буровой шламы, сточные воды, содержащие различные химические соединения, попадая в почву, вызывают глубокие и часто необратимые изменения физических, морфологических, физико-химических, микробиологических свойств, а иногда и существенную перестройку почвенного профиля, что приводит к потере плодородия и отторжению загрязненных территорий из сельскохозяйственного оборота. Углеводороды нефти способны образовывать в процессе трансформации токсичные соединения, обладающие канцерогенными свойствами и способностью переходить в растения, что значительно снижает качество возделываемых культур и создает определенную угрозу для здоровья человека [1-4]. Нефтепродукты обнаруживаются даже в местах, свободных от хозяйственной деятельности человека (заповедниках, труднодоступных территориях), т.к. транспортируются воздушными и водными потоками [5]. Естественное самоочищение и восстановление почв от нефтяного загрязнения является длительным процессом, продолжающимся от нескольких лет до нескольких десятилетий в зависимости от уровня загрязнения, состава нефти, свойств почвы и т.д. [6]. В связи с этим проблема рекультивации нефтезагрязненных почв стоит весьма остро. Среди всего спектра методов устранения последствий углеводородных загрязнений, биологические справедливо признаны наиболее безвредны-

ными для окружающей среды и экономически целесообразными. Особенно перспективным является метод биоремедиации, основанный на использовании высокоэффективных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов, выделенных из загрязненных природных объектов. К его преимуществам кроме экологической и гигиенической безопасности относят низкую себестоимость, возможность целенаправленного применения в нужном месте в нужное время, высокую скорость усвоения и переработки микроорганизмами загрязнителей на безвредные для окружающей среды продукты жизнедеятельности бактерий. В процессе биоремедиации углерод из нефти и нефтепродуктов частично преобразуется в углекислый газ, частично переходит в биомассу клеток, и частично трансформируется в гумус и закрепляется в почве.

В связи с этим особый интерес представляют исследования, направленные на выделение и отбор наиболее активных углеводородокисляющих микроорганизмов, способных перерабатывать и утилизировать нефть и ее составляющие [7-9]. При кажущейся простоте решения данной задачи возникает ряд трудностей. Во-первых, необходимо выделить технологичные, т.е. пригодные для промышленного использования и безопасные для людей микроорганизмы; во-вторых, подобрать условия их культивирования; в-третьих, правильно выбрать время, метод и дозу внесения биодеструкторов в почву. Кроме того, необходим контроль за интегральной токсичностью почвы для гарантии безопасности продуктов разложения поллютантов и достаточной степени очистки почвы. В настоящее время в России и за рубежом разработано несколько десятков эффективных биопрепаратов-нефтедеструкторов [10-17], действие которых основано на использовании уникальных возможностей углеводородокисляющих микроорганизмов, входящих в их состав. Однако проблема создания новых биопрепаратов продолжает оставаться актуальной. Это связано с невозможностью унифицировать (стандартизировать) биопрепараты для различных объектов окружающей среды, видов нефтяных загрязнений, климатических условий, состава почвы и пр.

Коршунова Татьяна Юрьевна, к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: korshunovaty@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

Целью работы являлся поиск, выделение из техногенной среды и описание физиолого-биохимических и фенотипических свойств штамма микроорганизмов, его предварительная идентификация и исследование способности к утилизации нефти, нефтяных углеводородов и других классов органических соединений для оценки перспективности использования в качестве основы биопрепарата-нефтедеструктора.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Из образцов серой лесной почвы, искусственно загрязненной дизельным топливом, методом накопительных культур выделили микроорганизмы, способные использовать дизельное топливо в качестве единственного источника углерода и энергии. Для этого 1 г почвы помещали в колбы (объем 250 мл) со 100 мл жидкой минеральной среды Раймонда [18], куда вносили дизельное топливо в количестве 0,5-1% (по объему). Инкубирование проводили в лабораторном термостатируемом встряхивателе П-5.10–Э5960 при температуре 26-28°C и 160 об/мин в течение 10-14 сут при микроскопическом контроле роста микробного сообщества. Чистые культуры выделяли на агаризованной среде Раймонда, на поверхность которой наносили углеводородный субстрат – 100 мкл стерильного дизельного топлива. Культивирование микроорганизмов на чашках Петри осуществляли при температуре 30°C. Дифференциацию получившихся колоний производили по культурально-морфологическим признакам.

Чистоту выделенных культур проверяли общепринятыми методами – микроскопическим контролем и высевом на агаризованную среду МПА.

Идентифицировали чистые культуры микроорганизмов по морфологическим, физиологическим и биохимическим признакам, используя общепринятые руководства [19-21]. Определение антибиотикочувствительности проводили методом серийных разведений в агаре [22].

Выделение тотальной ДНК из колоний бактерий, выросших на твердой среде МПА выполняли с помощью комплекта реагентов «РИБО-сорб» торговой марки «АмплиСенс» (Россия) согласно рекомендациям производителя.

Аmplификацию фрагмента гена 16S рРНК производили с использованием бактериальных праймеров: прямого 27F (5'-AGAGTTTGATC(A/C)GGCTCAG-3') и обратного 1492R (5'-ACGG(C/T)TACSTTGTACGACTT-3').

Определение нуклеотидной последовательности амплифицированных фрагментов гена 16S рРНК осуществляли с применением набора реактивов Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3500 xl (Applied Biosystems, США). Продукты секвенирования очищали с помощью набора BigDye® X Terminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, США).

Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК предварительно анализировали используя пакет программ EzTaxon server 2.1 (<http://147.47.212.35:8080/index.jsp>). Далее сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК с таковыми типовых штаммов близкородственных видов выполняли с помощью программы CLUSTAL W [23].

Последовательности генов 16S рРНК выравнивали с соответствующими последовательностями ближайших видов бактерий с помощью SINA alignment service (<http://www.arb-silva.de/aligner/>) [24], согласно рекомендациям [25].

Дендрограммы выстраивали в программе MEGA версии 5 методом «присоединения ближайших соседей» (Neighbor-Joining method) [26] с использованием 2-х параметрической модели Кимура [27].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из загрязненной дизельным топливом серой лесной почвы выделено 48 изолятов микроорганизмов. В одном из них штамм ИБ ДТ-5.1/1 по совокупности культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств был идентифицирован как *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1.

Клетки штамма представляют собой неподвижные толстые, короткие палочки, часто встречаются кокковидные одиночные или сдвоенные формы, иногда в скоплениях, размеры 0,7-1,5 x 0,7-1,0 мкм. Размножаются делением (перетяжка и перегородка).

На плотных питательных средах колонии белые, круглые, плоские, гладкие, блестящие, с ровными краями, профиль равномерно возвышающийся, диаметр 2,0-2,5 мм.

Грамотрицательные, неподвижные, аэробные, каталазоположительные, оксидазоотрицательные, неспорообразующие бактерии. Не подвергают гидролизу казеин, крахмал, желатину. Не образуют сероводорода, индола и 3-кетолактозы при окислении лактозы. Потребляют цитрат и малонат. Не обладают липазной и лецитиназной активностью. Образуют кислоту из углеводов, при этом выделение газа не обнаружено. Разлагают мочевины и твин 20. Реакция Фогес-Проскауэра отрицательная. Способны переносить концентрацию NaCl не более 3% и рН среды в пределах 4,6-8,6. Максимальный рост наблюдается при рН 6,8-7,2. Растет при 10-42°C, оптимум температуры – 26-28°C.

Обладают устойчивостью к левомецитину, тетрациклину, фузидину, ванкомицину, ампициллину, бензилпенициллину. Чувствительны к ципрофлоксацину, стрептомицину, канамицину, неомицину.

В качестве единственного источника углерода и энергии используют углеводы (сахарозу, D-фруктозу, D-маннозу, D-глюкозу, D-лактозу, L-рамнозу, D-рафинозу, D-галактозу, D-мальтозу, D-ксилозу и L-арабинозу), спирты (сорбит, маннит, глицерин), аминокислоты (D-аланин, D-

фенилаланин, DL-серин, DL-метионин, D-тирозин, DL-триптофан, D-валин, D-лейцин).

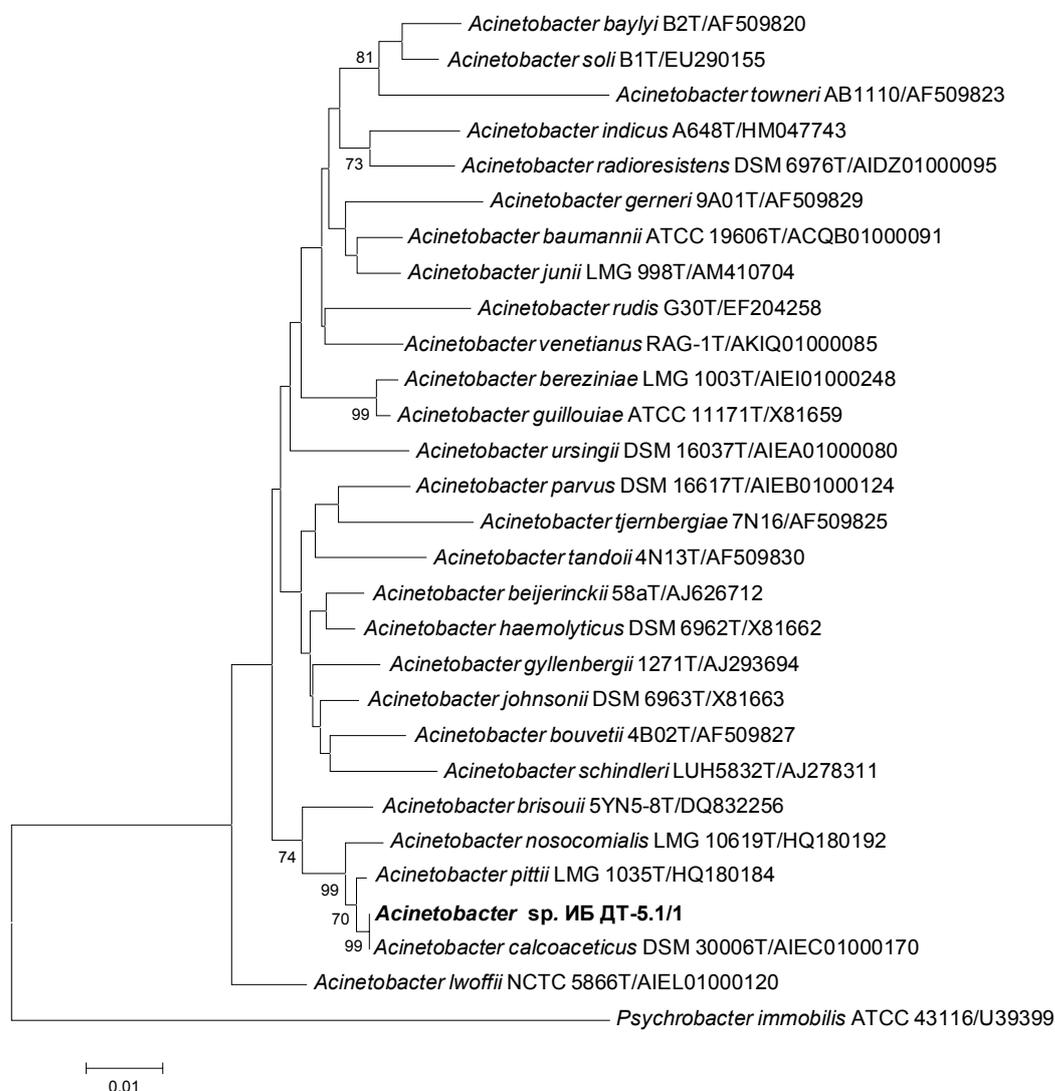
Утилизируют разнообразные органические вещества: нефть, углеводороды алканового ряда (декан, ундекан, тридекан), циклогексан, хлорпроизводные углеводородов (изобутил хлористый, этиловый эфир трихлоруксусной кислоты), ароматические соединения (бензол, толуол, о-ксилол), спирты (диэтиленгликоль, изопропиловый спирт, глицерин), кислоты (масляная, изовалериановая, капроновая). Широкий спектр деструктурируемых соединений создает предпосылки для использования штамма *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 для очистки окружающей среды от различных загрязнителей.

Для более точной идентификации бактерии проведено секвенирование и сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рНК с известными структурами из GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), согласно которому с высокой долей вероятности (99,93%) можно утверждать, что изучаемый микроорганизм относится к роду *Acinetobacter*.

Для уточнения филогенетического положения нового штамма был проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК видов, относящихся к роду *Acinetobacter* и построена дендрограмма (рис.). На рисунке видно, что бактерия *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1, возможно, принадлежит к виду *Acinetobacter calcoaceticus*.

В дальнейшем планируется изучение хемотаксономических характеристик и уточнение видовой принадлежности штамма, а также проверка способности бактерий *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 к очистке нефтезагрязненной почвы в лабораторных и полевых условиях.



**Рис.** Филогенетическое положение штамма *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 согласно анализу нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 1 нуклеотидной замене на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа (показаны величины показателя “bootstrap”-анализа выше 70%). В качестве внешней группы использована нуклеотидная последовательность гена 16S рНК *Psychrobacter immobilis* ATCC 43116/U39399

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гурова Т.Ф., Назаренко Л.В. Основы экологии и рационального природопользования: Учеб. пособие. М.: ОНИКС, 2005. 224 с.
2. Сулейманов Р.Р., Габбасова И.М., Ситдииков Р.Н. Изменение свойств нефтезагрязнённой серой лесной почвы в процессе биологической рекультивации // Изв. РАН. Сер. биол. 2005. № 1. С. 109-115.
3. Шорина Т.С., Русанов А.М., Сулейманова А.М. Влияние нефти на физические свойства чернозема обыкновенного степной зоны Урала // Вестник ОГУ. 2010. № 6. С. 137-139.
4. 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.
5. Давыдова С.Л., Тагасов В.И. Нефть и нефтепродукты в окружающей среде: Учеб. пособие. М.: Изд-во РУДН, 2004. 163 с.
6. Сулейманов Р.Р. Изменение свойств нефтезагрязнённых серых лесных почв при биологической рекультивации: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Уфа, 1999. 24 с.
7. Куликова И.Ю., Держинская И.С. Микробиологические способы ликвидации последствий аварийных разливов в море // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. 2008. № 5. С. 24-29.
8. Singer A.C., van der Gast C.J., Thompson I.P. Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation. TRENDS in Biotechnol. 2005. V. 23. N 2. P. 74-77.
9. Thompson I.P., van der Gast C.J., Ciric L., Singer A.C. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection // Env. Microbiol. 2005. V. 7. N 7. P. 909-915.
10. Кисин Д. В., Колесов А. И. Препараты серии «Биодеструктор» - эффективные средства для ликвидации нефтяных загрязнений // Нефтяное хозяйство. 1995. № 5-6. С. 83-85.
11. Ягафарова Г.Г. Экологическая биотехнология в нефтегазодобывающей и нефтеперерабатывающей промышленности: Учеб. пособие. Уфа: Изд-во УГНТУ, 2001. 214 с.
12. Ложинов О.Н., Нуртдинова Л.А., Бойко Т.Ф. и др. Оценка эффективности нового биопрепарата «Ленойл» для биоремедиации нефтезагрязнённых почв // Биотехнология. 2004. № 1. С. 77-82.
13. Маркарова М.Ю. Опыт применения биопрепарата «Универсал» для рекультивации нефтезагрязнённых земель // Вестник Института биологии Коми НЦ УрО РАН. 2004. № 10(84). URL: <http://www.ib.komisc.ru/t/ru/ic/vt/04-84/06.html/>.
14. Булатов А.И., Волощенко Е.Ю., Кусов Г.В., Савенок О.В. Экология при строительстве и эксплуатации нефтяных и газовых скважин. Краснодар: Просвещение-Юг, 2010.
15. Рогозина Е.А., Андреева О.А., Жаркова С.И., Мартынов Д.А., Орлова Н.А. Сравнительная характеристика отечественных биопрепаратов, предлагаемых для очистки почв и грунтов от загрязнения нефтью и нефтепродуктами // нефтегазовая геология. Теория и практика. 2010. Т. 5. N 3. URL: [http://www.ngtp.ru/rub/7/37\\_2010.pdf/](http://www.ngtp.ru/rub/7/37_2010.pdf/).
16. Чертков А. Микроорганизмы-уборщики // Эксперт. 2011. № 12. С. 78.
17. Murygina V., Markarova M., Kalyuzhnyi S. Application preparation «Rhoder» for remediation of oil polluted polar marshy wetlands in Komi Republic // Environment International. 2005. V. 31. N 2. P. 163-166.
18. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // Develop. Industr. Microbiol. 1961. V. 2. N 1. P. 23-32.
19. Методы общей бактериологии. Т. 3 / Под ред. Ф. Герхардта. М.: Мир, 1984. 264 с.
20. Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н., Лысак Л.В. Методы идентификации и выделения почвенных бактерий. М.: Изд-во МГУ, 1990. 76 с.
21. Определитель бактерий Берджи. Т. 1, 2 / Под ред. Дж. Хоулта. М.: Мир, 1997.
22. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. М., 2004. 91 с.
23. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids Res. 1994. V. 22. N 22. P. 4673-4680.
24. Pruesse E., Peplies J., Glöckner F.O. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes // Bioinformatics. 2012. V. 28. N 14. P. 1823-1829.
25. Tindall B.J., Rosselló-Móra R., Busse H.J. et al. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. N 1. P. 249-266.
26. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. and Evol. 1987. V. 4. N 4. P. 406-425.
27. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J. Mol. Evol. 1980. V. 16. N 2. P. 111-120.

## PROPERTIES AND PHYLOGENETIC PROVISION OF THE BACTERIUM *ACINETOBACTER* SP. ИБ ДТ-5.1/1

©2013 T.Yu. Korshunova, S.R. Mukhamatdyarova, O.N. Loginov

Institute of Biology, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

From grey forest soil with diesel fuel strain *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 was allocated. Cultural, phenotypical, biochemical and phylogenetic features of a strain are studied. Abilities of a bacterium to utilization of oil, hydrocarbons and other organic substances of the various nature are shown.

**Key words:** strain *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1, cultural, physiological, biochemical features, phylogenetic tree.

Tatyana Korshunova, Candidate of Biology, senior researcher, e-mail: korshunovaty@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