

БИОЛОГИЯ

УДК 579.222.2:579.252.5

БИОДЕГРАДАЦИЯ НЕФТЯНЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ ШТАММОМ *DIETZIA MARIS*, ЕЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

Е.В. Плешакова, С.Н. Голубев*, О.В. Турковская*

Саратовский государственный университет,
кафедра биохимии и биофизики
E-mail: biofac@sgu.ru

* Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов
E-mail: ecbio@ibppm.sgu.ru

Показана способность штамма *Dietzia maris* AM3, выделенного из нефтяного шлама, к активной утилизации углеводородов нефти. У данного штамма, способного разрушать нефтяные углеводороды на 50–70% и в кислой, и в нейтральной среде, выявлены плазмиды размером около 54 т.п.н. Частота индуцированной элиминации свойства деструкции углеводородов нефти у штамма *D. maris* AM3 составила 14.0%. Клоны *D. maris* AM3, утратившие плазмидную ДНК, характеризовались частичной элиминацией способности к деструкции нефтяных углеводородов, что может свидетельствовать о плазмидной локализации генов деструкции.

Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Strain *Dietzia Maris* and Its Genetic Peculiarities

E.V. Pleshakova, S.N. Golubev, O.V. Turkovskaya

The ability of strain *Dietzia maris* AM3, isolated from oil-slime, for active utilization of petroleum hydrocarbons was shown. Plasmids (size, near 54 kb) were found in this strain, capable of degrading petroleum hydrocarbons by 50–70% both in acid and in neutral media. The frequency of induced elimination of the property of degrading petroleum hydrocarbons in strain *D. maris* AM3 was 14.0%. The clones of *D. maris* AM3, which had lost their plasmid DNA, were characterized by partial elimination of the ability to degrade petroleum hydrocarbons, which may suggest that the degradation genes are localized on the plasmid.

В настоящее время известно немало микроорганизмов-деструкторов нефти и нефтепродуктов, которые используются в технологиях биоремедиации загрязненных объектов окружающей среды [1–4]. Нефтеоокисляющие штаммы, интродуцируемые в загрязненную почву или воду, должны обладать определенными свойствами: высокой метаболической активностью и скоростью потребления углеводородов (УВ) нефти, конкурентной способностью по отношению к аборигенным углеводородоокисляющим микроорганизмам и способностью к длительному выживанию в изменяющихся условиях окружающей среды.

Перед применением таких специализированных штаммов требуется их всестороннее изучение. Исследование генетической организации нефтеоокисляющих штаммов-интродуцентов, накопление знаний о функционировании, передаче и экспрессии хромосомных или плазмидных генов биодegradации, изучение возможности применения методов генетической инженерии к этим бактериям необходимы для их длительной биотехнологической эксплуатации [5–7].

НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ



Объектом наших исследований явился штамм *Dietzia maris* AM3, выделенный прямым высевом из нефтешлама (г. Саратов). Этот штамм был идентифицирован в ВКПМ (г. Москва). Установлено, что изучаемый микроорганизм обладал рядом экологических преимуществ, поскольку хорошо рос в присутствии 10% NaCl, а также в достаточно широком диапазоне температур – от 10 до 40°C и pH – от 4 до 9 [8].

Способность штамма использовать для роста нефть и нефтепродукты определяли с помощью чашечного метода Мак-Кланга, согласно которому отмечалось наличие роста культуры вокруг и внутри капель нефтяного субстрата на поверхности плотной минеральной среды [9]. Способность штамма к деструкции индивидуальных углеводов (0,4 г/л) определяли с помощью метода лунок [10]. В результате изучения субстратного спектра штамма *D. maris* AM3 было показано, что он способен использовать для роста в качестве единственного источника углерода и энергии широкий набор нефтепродуктов и индивидуальных углеводов: *n*-алканов (октан, гексан, гептан, декан, тридекан, гексадекан, гептадекан); ароматических соединений (толуол, ксилол, фенол, псевдокумол, амилбензол) и нафтен (декалин). Штамм хорошо рос на среде с вазелиновым маслом, дизельным топливом, сырой нефтью, исключением являлся керосин, на котором рост отсутствовал.

Степень деградации нефти (10 г/л) и мазута (25 г/л) данным штаммом в жидкой минеральной среде за 14 сут культивирования составила 70.0 и 8.1% соответственно. Эмульгирующая активность *D. maris* AM3 по отношению к нефти, определенная методом Купера [11], соответствовала достаточно высоким значениям: $E_{24} = 48\%$; $E_{48} = 36\%$.

Интересной особенностью оказалась выявленная у изучаемого штамма способность к деструкции нефтяных углеводов в кислой среде. По данным газовой хроматографии деструкция гептадекана (2.5%) в жидкой среде за 7 сут культивирования составила 53.6% при pH 7 и 51.5% при pH 4.6. В связи с тем, что нередко встречаются кислые почвы и сточные воды, требующие очистки от нефтяных загрязнений [12], это свойство штамма *D. maris* AM3 может использо-

ваться для биоремедиации нефтезагрязненных объектов, характеризующихся повышенной кислотностью.

При плазмидном скрининге методом, основанном на распределении в системе полиэтиленгликоль–декстран [13], у исследуемого штамма обнаружены плазмидные ДНК размером около 54 т.п.н. Получены доказательства стабильности плазмидных ДНК при культивировании изучаемого штамма-деструктора *D. maris* AM3 в неселективных условиях (до 10 пассажей на МПА) и в условиях длительного хранения (5 лет) в коллекции.

Для изучения индуцированной элиминации свойства биodeградации углеводов нефти у штамма *D. maris* AM3 исследовалось воздействие [14] различных ингибирующих агентов (митомицин С, этидий бромид, профлавин, акридиновый оранжевый, налидиксовая кислота) на жизнеспособность и изменчивость штамма. Результаты экспериментов показали, что микроорганизм чувствителен к действию даже незначительных (10 мкг/мл) концентраций большинства ингибиторов. В ходе исследований была установлена субингибирующая концентрация только для одного ДНК-тропного агента – налидиксовой кислоты, которая составила 25 мкг/мл. Обработка штамма *D. maris* AM3 этим ингибитором привела к возникновению клонов с редуцированной способностью к утилизации нефтяных углеводов. Частота выявления таких клонов на агаризованной среде, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии сырую нефть, составила 14.0%.

Последующий скрининг плазмидных ДНК в 38 отобранных элиминантных клонах показал наличие экстрахромосомных элементов в большинстве из них. В то же время было установлено, что 4 клон утратили 54-т.п.н. плазмиды. На рис.1 представлен результат одного из электрофоретических анализов клонов *D. maris* AM3 с пониженной деструктивной активностью по отношению к углеводам нефти, в котором были выявлены бесплазмидные варианты.

Морфологические колонии четырех бесплазмидных клонов: 15н, 34н, 44н, 45н не отличались от исходного штамма *D. maris* AM3, это были колонии с гладкой блестящей поверхностью и характерной яркой кораллово-

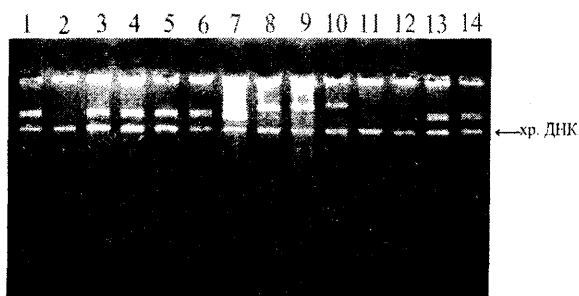


Рис.1. Выявление плазмидных ДНК в клонах штамма *D. maris* AM3, частично утративших способность к деградации нефтяных углеводородов: 1 – исходный штамм; 2 – 15н; 3 – 17н; 4 – 21н; 5 – 23н; 6 – 31н; 11 – 34н; 12 – 44н; 13 – 46н; 14 – 47н; маркерные плазмиды: 7 – RP4 (39 т.п.н.); 8 – R1 (93 т.п.н.); 9 – R16 (103,5 т.п.н.); 10 – R386 (117 т.п.н.)

красной окраской. Результат иммунодиффузионного анализа со специфическими антителами данного штамма, осуществленного по методу [15], показал, что углеводные антигены клеточной поверхности элиминантных клонов не претерпели каких-либо изменений и абсолютно идентичны данным структурам исходного штамма *D. maris* AM3.

Количественная оценка деструктивной активности четырех вышеназванных элиминантов по отношению к сырой нефти (10 г/л) при культивировании их в жидкой среде показала (рис. 2) заметное снижение способности к деструкции сырой нефти (в 2–5 раз).

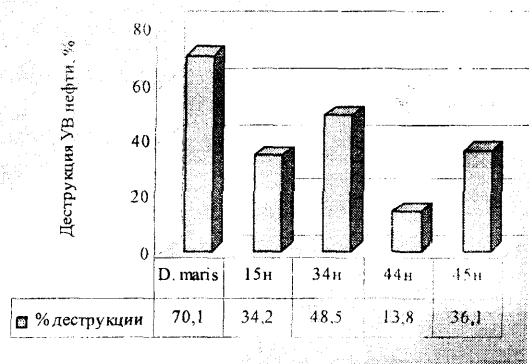


Рис.2. Деструктивная активность элиминантов *D. maris* AM3 по отношению к сырой нефти (10 г/л) при культивировании их в жидкой среде в течение 14 сут

Установлено также, что у элиминантов степень деградации индивидуального нефтяного углеводорода гептадекана в жидкой среде (2.5%) была сравнима с уровнем его разрушения исходным штаммом *D. maris*

AM3. С помощью качественного анализа показано, что у элиминантных клонов утрачивалась способность к утилизации декалина.

Необходимо отметить, что нефть – чрезвычайно гетерогенный субстрат, она состоит из углеводов различных классов. И, несомненно, гены деструкции многочисленных нефтяных углеводов не могут быть локализованы на одной плазмидной молекуле. Однако полученные данные о высокой частоте (14.0%) индуцированной элиминации свойства биodeградации углеводов нефти, заметном снижении способности к деструкции нефти и декалина при утрате плазмидной ДНК штаммом *D. maris* AM3 свидетельствуют об участии плазмидных генов в процессе биodeградации нефтяных углеводов.

Библиографический список

1. Sharma S.L., Pant A. Biodegradation and conversion of alkanes and crude oil by a marine *Rhodococcus* sp. // Biodegradation. 2000. V.11. P.289–294.
2. El Fantroussi S., Agathos S. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? // Current Opinion in Microbiology. 2005. V.8, №3. P.268–275.
3. 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. P.3763–3768.
4. Андреева И.С., Емельянова Е.К., Загребельный С.Н. и др. Психротолерантные штаммы-нефтедеструкторы для биоремедиации почв и водной среды // Биотехнология. 2006. №1. С.43–52.
5. Larkin M.J., De Mot R., Kulakov L.A., Nagy I. Applied aspects of *Rhodococcus* genetics // Antonie van Leeuwenhoek. 1998. V.74. P.133–153.
6. Pepper I.L., Gentry T.J., Newby D.T. et al. The role of cell bioaugmentation and gene bioaugmentation in the remediation of co-contaminated soils // Environmental Health Perspectives Supplements. 2002. V.110, №6. P.943–946.
7. Ахметов Л.И., Иванова Е.С., Пунтус И.Ф. и др. Горизонтальный перенос плазмиды биodeградации нафталина в процессе микробной деструкции дизельного топлива и нефти в открытом проточном биореакторе // Биотехнология. 2006. №4. С.79–86.
8. Пleshакова Е.В., Матора Л.Ю., Турковская О.В. Интродукция нефтеокисляющего штамма *Dietzia maris* в загрязненную почву: Сб. ст. / Под ред. О.В. Турковской. Саратов: Научная книга, 2005. С.148–156.
9. Теттер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. М.: Колос, 1993. 175 с.
10. Практикум по микробиологии. / Под ред. Н.С. Егорова. М.: Изд-во МГУ, 1976. 307 с.
11. Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surface active agents from two *Bacillus* species // Appl. Environ. Microbiol. 1987. V.53, №2. P.224–229.



12. *Gemmell R.T., Knowles C.J.* Utilisation of aliphatic compounds by acidophilic heterotrophic bacteria. The potential for bioremediation of acidic wastewaters contaminated with toxic organic compounds and heavy metals // *FEMS Microbiology Letters*. 2000. V.192. P.185–190.

13. *Голубев С.Н.* Криптические миниплазмиды азоспиррилл: разработка эффективных методов выделения и характеристика репликонов: Дис. ... канд. биол. наук. Саратов, 2002. 209 с.

14. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 440 с.

15. *Ouchterlony O., Nilsson L.-A.* Immunodiffusion and immunoelectrophoresis // *Handbook of experimental immunology*. V.I. Immunochemistry / Ed. D.M. Weiz. Oxford: Alden Press, 1979. P.19–33.