

Саратовский государственный университет
им. Н.Г. Чернышевского
Матора Л.Ю., Турковская О.В.
Институт биохимии и физиологии растений
и микроорганизмов РАН (Саратов)

НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИЙ ШТАММ *DIETZIA MARIS* И ВОЗМОЖНОСТИ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ ЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ*

Аннотация. Показано, что интродукция штамма *Dietzia maris* AM3 в нефтезагрязненную почву ускоряла процесс ее очистки в течение первого месяца в 2 раза по сравнению с приемом стимуляции естественной микрофлоры. После культивирования штамма в данной почве в течение 3 месяцев произошло повышение его антибиотикоустойчивости, но не изменился плазмидный профиль и деструктивная активность. Успешно апробирован иммунохимический тест для мониторинга штамма *D. maris* AM3 в почве.

Ключевые слова: нефтезагрязненная почва, биоремедиация, интродукция, штамм *Dietzia maris*.

E. Pleshakova, L. Matora
Saratov State University
Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov
O. Turkovskaya
Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms
AN OIL-OXIDIZING STRAIN OF *Dietzia maris* AND THE PROSPECTS OF ITS USE
IN BIOREMEDIATION OF CONTAMINATED SOIL

Abstract. It was shown that introducing of *Dietzia maris* strain into the oil polluted soil accelerated the cleanup process by 2 times within the first month of remediation, in comparison with the stimulation of the indigenous microflora. After cultivation of the strain in this soil during three months an increase in its antibiotic stability took place but the plasmid profile and degradative activity did not change. The immunochemical method for monitoring *D. maris* AM3 in soil was successfully tested.

Key words: oil-contaminated soil, bioremediation, introduction, strain *Dietzia maris*

ВВЕДЕНИЕ

При выборе способа очистки загрязненных почв в последнее время все чаще отдаются предпочтение биостимуляции аборигенной микробной популяции *in situ*. Однако в ряде случаев, когда физико-химические характеристики места загрязнения делают невозможным рост естественной микрофлоры или загрязнитель устойчив к ее воздействию, а также, если концентрация загрязнителя в почве относительно высока или низка – более целесообразным оказывается применение биоаугментации [12; 15].

Многие экологические аспекты проблемы интродукции, касающиеся жизнеспособности и активности интродуцированных микроорганизмов в почве, их взаимоотношений с аборигенными микроорганизмами, до сих пор изучены недостаточно. В связи с этим активно разрабатываются различные мониторинговые методы для идентификации вне-

* © Плешакова Е.В., Матора Л.Ю., Турковская О.В.

сенных в почву бактерий, требующие высокой специфичности и чувствительности. Это молекулярные методы слежения за бактериями в окружающей среде, основанные на анализе специфических последовательностей ДНК: ПЦР амплификация или гибридизация нуклеиновых кислот, использование биомаркеров в качестве специфических меток [14] и другие.

Для эффективного внедрения интродуцента в микробное сообщество нефтезагрязненной почвы он должен обладать следующими свойствами: высокой метаболической активностью и скоростью потребления углеводов нефти, а также высокой конкурентной способностью по отношению к аборигенным углеводородокисляющим микроорганизмам (УОМ). Интродукция селекционированных микроорганизмов, изолированных из загрязненного местообитания, дает определенные преимущества, т.к. эти бактерии, способные разлагать нефтепродукты, обладают более высокой устойчивостью к токсичности поллютанта и изменениям в окружающей среде.

Нокардиоподобные микроорганизмы, благодаря широкому распространению в природных биотопах и высокой метаболической активности, а также способности разрушать углеводороды нефти, доминируют среди известных бактерий-деструкторов нефтепродуктов и нередко применяются для ускорения биологического разрушения нефтяных углеводородов в природной среде [1; 17].

Цель нашей работы состояла в оценке возможности использования нового штамма *Dietzia maris* АМЗ для очистки нефтезагрязненных почв.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования являлся штамм *Dietzia maris* АМЗ, выделенный прямым высевом из нефтешлама (г. Саратов). Данный штамм был идентифицирован в ВКПМ (г. Москва).

При изучении субстратного спектра штамма в качестве единственного источника углерода и энергии в среду вносили один из субстратов: сырую нефть, керосин, вазелиновое масло, дизельное топливо и ряд индивидуальных *n*-алканов и ароматических углеводородов. Способность штамма использовать для роста нефть и нефтепродукты определяли с помощью метода Мак-Кланга, согласно которому отмечалось наличие роста микроорганизма вокруг и внутри капель нефтяного субстрата на поверхности агаризованной минеральной среды М9 [9]. Способность штамма к деструкции индивидуальных углеводородов парафинового ряда (0,4 г/л) определяли с помощью метода лунок [7]. Количественную оценку деструктивной активности *D. maris* АМЗ производили при культивировании штамма в жидкой среде М9 с добавлением к ней в качестве единственного источника углерода (г/л): нефти – 10 или мазута – 25. Способность культуры к эмульгированию нефти определяли методом Купера [11].

Плазмидную ДНК выявляли с помощью электрофореза в агарозном геле [2]. Чувствительность штамма к антибиотикам определяли с помощью стандартных индикаторных дисков. Результаты учитывали на 3-7 сут. путем измерения в мм зоны задержки роста вокруг соответствующего диска.

Для получения антител, специфичных к углеводным антигенам клеточной поверхности *D. maris* АМЗ, использовали методику иммунизации животных целыми бактериальными клетками, предварительно обработанными 2% глутаровым альдегидом [5]. Культуры клеток выращивали на L-бульоне. Клетки осаждали центрифугированием, дважды отмывали в забуференном физиологическом растворе, г/л: K_2HPO_4 – 0,43, Na_2HPO_4 – 1,68, NaCl – 7,2; рН 7,2 и переносили в тот же буфер, содержащий 2 % глутарового альдегида. Полученную суспензию клеток хранили при +4°C. Непосредственно

перед иммунизацией клетки дважды отмывали в забуференном физиологическом растворе. Использовали суспензии клеток с оптической плотностью $A_{540}=0,5$ (кювета с $l=1\text{см}$), что соответствует 10^8 кл/мл. Животных иммунизировали 6 раз ежедневно внутривенным введением суспензий клеток объемом от 0,4 до 1,6 мл. Спустя неделю инъекции повторяли 4 раза (ежедневно), используя по 2 мл суспензии. Отбор крови проводили через 6 сут. после последней иммунизации.

Антитела получали из антисывороток осаждением сульфатом аммония. Титр антител определяли в реакциях иммунодиффузии [16] и агглютинации.

Для получения препаратов углеводных антигенов клетки отмывали в забуференном фосфатном растворе, осаждали центрифугированием и выдерживали в течение 30 мин. при комнатной температуре в экстрагирующем буфере следующего состава: 0,1 М трис-НСl, 10 мМ ЭДТА, 0,1 мМ фенилметансульфонилфторид, 1 % Тритон Х-100 (с концентрацией 0,05 мМ ЭДТА на 1 г влажных клеток). Экстрагированные антигены отделяли от клеток центрифугированием.

При определении экологической взаимосвязи интродуцента с естественной почвенной микрофлорой производили посев выделенных аборигенных культур штрихом с помощью петли на поверхность плотной питательной среды, затем перпендикулярно к этим культурам также штрихом засевали изучаемый штамм-деструктор, предназначенный для интродукции в почву. Через 3-5 сут. учитывали особенности роста культур в местах пересечения.

В модельном почвенном эксперименте использовали смешанный образец чернозема южного, отобранного в Саратовской области. Численность общей гетеротрофной микрофлоры (ОГМ) составляла $1,35 \times 10^7$, число УОМ – $8,75 \times 10^5$ кл/г. Почву высушивали до воздушно-сухого состояния и просеивали через сито с диаметром отверстий 1 мм. Для эксперимента в почву дозированно вносили различные реагенты, г/кг: нефть 20, минеральное удобрение азофоску, являющееся источником азота и фосфора, 0,7 и древесные опилки 1/3 объема почвы в качестве структуратора, увлажняли до 15 % влажности, перемешивали и инкубировали в пластмассовых контейнерах при температуре 25°C. В процессе ремедиации регулярно производили рыхление и полив почвы. Штамм *D. maris* АМЗ вносили в почву в количестве 1×10^7 кл/г почвы. В качестве сравнительного варианта использовали нефтезагрязненную почву с минеральным удобрением и структуратором, но без внесения штамма. Этими добавками в сравнительном варианте стимулировали аборигенную микрофлору. Каждый вариант был представлен в трех повторностях.

ОГМ в почве учитывали чашечным методом на МПА, УОМ выявляли на агаризованной минеральной среде с дизельным топливом в качестве единственного источника углерода и энергии [3]. Содержание нефтепродуктов в почве определяли гравиметрическим методом [8]. Анализ их фракционного состава проводили по методу Л.Г. Полуниной и Г.И. Кушина [6]. Почву исследовали на дыхательную, дегидрогеназную и каталазную активность [10].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы Microsoft Excel 2003.

Результаты и их обсуждение

Штамм *Dietzia maris* АМЗ, выделенный из нефтешлама, отличался кораллово-красным цветом колоний с гладкой блестящей поверхностью, очень короткими, овальными У-образно расположенными палочковидными клетками, размножающимися путем бинарного деления. По хемотаксономическому критерию данный штамм характеризовался IV типом клеточной стенки, содержащей в своем составе *meso*-ДАПК, арабинозу, галак-

тозу. Установлено, что изучаемый штамм обладал рядом экологических преимуществ, поскольку хорошо рос в присутствии 10 % NaCl, а также в достаточно широком диапазоне температур: от 10 до 40°C и в диапазоне pH: от 4 до 9.

В результате изучения субстратного спектра штамма было показано, что на агаризованной минеральной среде он способен использовать для роста в качестве единственного источника углерода и энергии широкий набор нефтепродуктов и индивидуальных углеводородов – *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 (E_{24}) *D. maris* AM3 по отношению к нефти соответствовала 48,0 %.

Интродуцируя нефтеокисляющий штамм *D. maris* AM3 в загрязненную почву, мы планировали исследовать его жизнеспособность, конкурентноспособность по отношению к естественной микрофлоре и оценить эффективность использования штамма для очистки почвы.

Для определения экологической совместимости штамма *D. maris* AM3 с естественной почвенной микрофлорой из исходной почвы был выделен ряд аборигенных нефтеокисляющих штаммов, которые затем выращивали совместно с исследуемым деструктором AM3. Визуализация особенностей роста культур в местах пересечения показала полное отсутствие какого-либо угнетения роста *D. maris* AM3, несмотря на его замедленное развитие (на 5 сут.) по сравнению с остальными исследуемыми быстрорастущими штаммами. Было установлено, что штамм обладал высокой конкурентной способностью по отношению к этим бактериям.

Для идентификации и мониторинга бактерий *D. maris* AM3, интродуцированных в нефтезагрязненную почву, был успешно апробирован иммунохимический тест на основе полученных поликлональных кроличьих антител, специфичных к углеводным антигенам клеточной поверхности данного штамма. Отработана качественная реакция, включающая высев бактерий из очищаемой почвы на МПА (методом последовательных разведений), получение препаратов углеводных антигенов и исследование данных антигенов в тесте иммунодиффузии со специфическими антителами. Продемонстрировано, что данный тест позволяет быстро и однозначно идентифицировать интродуцированный в почву штамм *D. maris* AM3 (рис. 1А).

Установлено, что полученные антитела могут выявлять специфический антиген не только в составе препаратов, изолированных с бактериальной поверхности *D. maris* AM3, но также и в супернатанте его культуральной среды (рис. 1Б), что свидетельствует о высокой экскреции данного антигена исследуемыми бактериями в окружающую среду. Этот факт создает предпосылки для создания высокочувствительного теста на основе иммуноферментного анализа, который сделает возможным выявление изучаемого штамма-деструктора непосредственно в почвенной суспензии, минуя стадию посева бактерий на питательную среду.

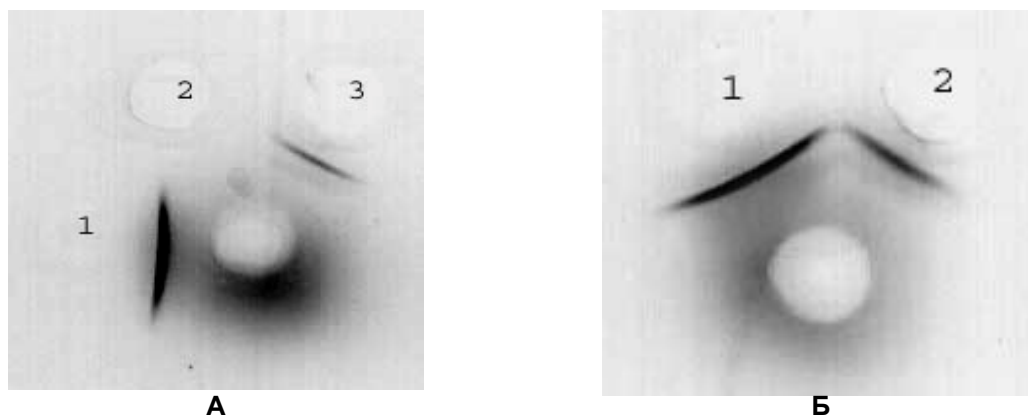


Рис. 1. А – Результат иммунодиффузионного анализа со специфическими антителами следующих препаратов изолированных углеводных антигенов: *D. maris* AM3 (1), бактериальных клеток, высеянных из нефтезагрязненной почвы до интродукции (2), и после интродукции (3) данного штамма; Б – Сравнительный иммунодиффузионный анализ препарата углеводных антигенов, выделенных с бактериальной поверхности *D. maris* AM3 (1), и супернатанта культуральной среды данного штамма (2)

Параллельно вышеописанному методу производился учет численности ОГМ и УОМ в ходе эксперимента, результаты которого представлены на рис. 2.

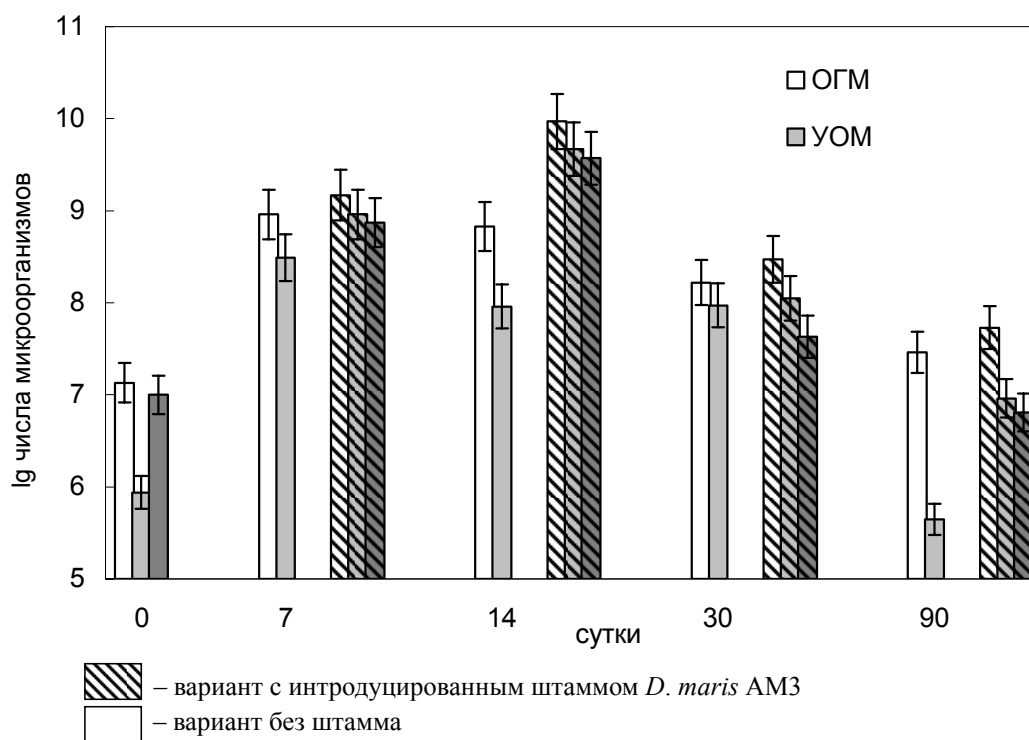


Рис. 2. Динамика численности микроорганизмов в почвенных образцах в процессе биоремедиации

Исследование динамики микроорганизмов классическими методами на агаризованных средах осуществлялось для количественной оценки численности интродуцированных и аборигенных бактерий и служило дополнительным контролем при разработке нового иммунохимического тестирования. Яркий характерный цвет колоний *D. maris* AM3 позволял легко учитывать численность интродуцированного штамма как на МПА, так и на среде для выявления нефтеокисляющих микроорганизмов. Максимальное увеличение

его численности наблюдалось на 14 сут. эксперимента: до $3,73 \times 10^9$ кл/г, что в 373 раза больше исходного уровня внесения. Численность УОМ в этом варианте в этот же период также была самая высокая: $4,67 \times 10^9$ кл/г, это примерно в 5,5 тысяч раз выше по сравнению с количеством УОМ в чистой почве ($8,75 \times 10^5$ кл/г).

Через 14 сут. наблюдалась наиболее заметная разница в численности УОМ и ОГМ между образцами почвы со штаммом и без него. Через 30 сут. культивирования количество микроорганизмов (и УОМ, и ОГМ) уменьшалось, а через 90 сут. приближалось к исходному уровню. Аналогичная динамика наблюдалась и с численностью интродуцированного штамма-деструктора.

Через 30 сут. биоаугментации деструкция нефти в почве с *D. maris* AM3 составила 38,8, а без него – 19,2 %. Значительная разница в степени разложения нефти свидетельствовала о высокой активности интродуцированного штамма в течение первого месяца очистки. Через 90 сут. эта заметная разница исчезла. Степень разрушения нефти в почве достигла в варианте с интродуцентом 66,5%, а в варианте с использованием приемов стимуляции аборигенной микрофлоры – 60,0%. Результаты фракционного анализа остаточной нефти в почве показали, что убыль нефти происходила в основном за счет разложения углеводородов нафтеново-парафиновой фракции: 56,3% – при использовании штамма-деструктора и 53,3% – при использовании стимуляции за 90 сут. На 52,1 и 60,0% соответственно элиминировали моно- и бициклические ароматические углеводороды, в меньшей степени разрушались ПАУ: на 41,4 и 23,2%, а также смолы и асфальтены: на 36,4 и 17,9 %.

В процессе биоаугментации была определена дегидрогеназная активность почвы (рис. 3А). Следует отметить, что через 3 сут. после внесения нефти в чистую почву активность дегидрогеназ снизилась на 33,3 %. Спустя 30 сут. этот показатель в варианте без штамма несколько повысился, но все равно был ниже исходного, в то время как присутствие штамма-интродуцента в опытном варианте вернуло дегидрогеназную активность к норме. Более низкая активность в загрязненной почве без штамма объясняется, вероятно, ингибирующим влиянием нефти на почвенное микробное сообщество. Через 3 месяца дегидрогеназная активность в варианте с интродуцентом значительно превышала активность в контрольном варианте (в 4 раза) и была почти в 2 раза выше, чем в исходной чистой почве.

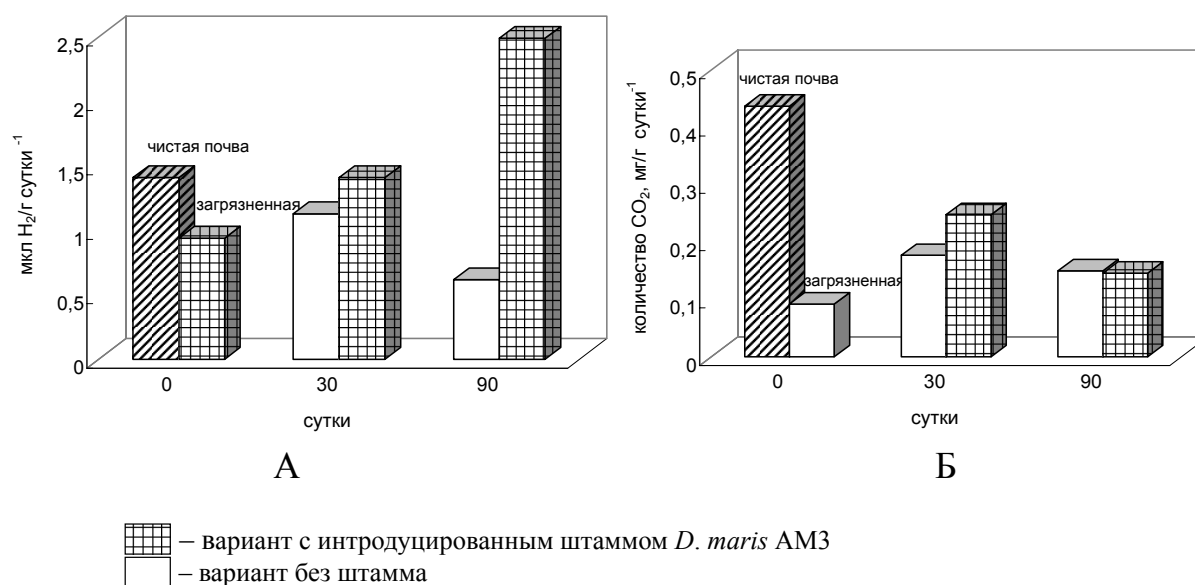


Рис. 3. Динамика показателей биологической активности почвы в процессе биоремедиации:

А – дегидрогеназной; Б – дыхательной активности

В то же время происходило увеличение активности почвенной каталазы, отсутствующее в варианте без интродуцента. Несмотря на уменьшение численности ОГМ и УОМ через 90 сут. культивирования, дегидрогеназная активность почвы оставалась высокой, вероятно, за счет внеклеточной ферментативной активности. В связи с этим следует отметить, что количественные изменения, происходящие в микробном ценозе загрязненной почвы, не всегда отражают изменения ее биологической активности.

Внесение микроорганизма-деструктора оказало влияние и на почвенное дыхание (рис. 3Б). После значительного снижения дыхательной активности в свежезагрязненной почве с ходом ремедиации наблюдалось ее восстановление, и через 30 сут. в варианте с интродуцентом она была уже в 1,4 раза выше активности контрольной почвы. Через 3 месяца эти показатели несколько понизились в почвенных образцах, в которых наблюдалось также уменьшение численности микроорганизмов.

Итак, было показано, что внесение конкурентноспособного активного штамма-деструктора углеводов нефти *D. maris* AM3 в загрязненную почву ускоряло процесс очистки в 2 раза в течение первого месяца ремедиации по сравнению с приемом стимуляции. Присутствие штамма отчетливо увеличивало интенсивность ряда биохимических процессов в почве.

Известно, что потребление углеводородных субстратов во многом определяет своеобразие структурной и метаболической организации родококков и сопровождается появлением новых физиологических свойств [4]. В связи с этим были изучены некоторые свойства штамма *D. maris* AM3, выделенного из почвы после 3-х месяцев биоаугментации. Как показали наши исследования, исходный штамм *D. maris* AM3 при росте на полноценной питательной среде проявлял высокую и среднюю степень чувствительности к тестируемым антибиотикам: гентамицину, стрептомицину, хлорамфениколу, тетрациклину, карбенициллину, эритромицину, олеандомицину. После культивирования штамма AM3 в нефтезагрязненной почве в течение трех месяцев он приобрел устойчивость к гентамицину и тетрациклину. Способность родококков при росте на углеводородных субстратах повышать резистентность к широкому спектру антибиотических веществ была описана ранее [13]. Авторы объясняют это увеличением содержания суммарных клеточных липидов и насыщенных прямоцепочечных жирных кислот, снижающих проницаемость клеточной оболочки бактерий для молекул антибиотиков. При изучении деструктивной активности штамма *D. maris* AM3, выделенного из почвы после интродукции, было показано, что степень разрушения нефти в жидкой среде за 14 сут. культивирования исследуемым штаммом составляла 73,6 % и была сравнима с таковой для исходного штамма (70,0 %).

При плазмидном скрининге как у исходного штамма *D. maris* AM3, так и штамма, выделенного из почвы после биоремедиации, обнаружены 2 плазмидные полосы размером около 54 т.п.н., что свидетельствовало о стабильности плазмидных молекул при культивировании штамма в нефтезагрязненной почве.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования позволили охарактеризовать новый штамм *D. maris* AM3 как активный деструктор нефти и ряда нефтепродуктов. Была изучена возможность использования штамма для очистки нефтезагрязненной почвы путем его интродукции. При этом показано, что внесение штамма *D. maris* AM3 в загрязненную почву ускоряло процесс очистки в 2 раза в течение первого месяца ремедиации по сравнению с использованием стимуляции аборигенной микрофлоры. Следует подчеркнуть, что, несмотря на выравнивание после 3 месяцев очистки показателей разрушения нефтепро-

дуктов в почве в присутствии и отсутствии штамма, вариант с интродуцентом отличался более высокой интенсивностью ряда почвенных биохимических показателей: дегидрогеназной, каталазной и дыхательной активности. В ходе проведенных экспериментов был успешно апробирован иммунохимический тест для идентификации и мониторинга штамма *D. maris* AM3, интродуцированного в нефтезагрязненную почву. Показано, что после его культивирования в нефтезагрязненной почве в течение трех месяцев произошло повышение его антибиотикоустойчивости, но не изменился плазмидный профиль и деструктивная активность по отношению к нефтепродуктам.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Андреева И.С., Емельянова Е.К., Загребельный С.Н., Олькин С.Е., Резникова И.К., Репин В.Е. Психротолерантные штаммы-нефдетеструкторы для биоремедиации почв и водной среды // Биотехнология. – 2006. – № 1. – С. 43-52.
2. Голубев С.Н. Криптические миниплазмиды азоспирилл: разработка эффективных методов выделения и характеристика репликонов: Дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 2002. – 209 с.
3. Гузев В.С., Халимов Э.М., Волде М.И., Куличевская И.С. Регуляторное действие глюкозы на активность углеводородокисляющих микроорганизмов в почве // Микробиология. – 1997. – Т. 66, № 2. – С. 154-159.
4. Куюкина М.С., Ившина И.Б., Рычкова М.И. Чумаков О.Б. Влияние состава клеточных липидов на формирование неспецифической антибиотикорезистентности алканотрофных родококков // Микробиология. – 2000. – Т. 69, № 1. – С. 62-69.
5. Матора Л.Ю., Шварцбург Б.И., Щеголев С.Ю. Иммунохимический анализ О-специфических полисахаридов почвенных азотфиксирующих бактерий *Azospirillum brasilense* // Микробиология. – 1998. – Т. 67, № 6. – С. 815-820.
6. Методы анализа органического вещества пород, нефти и газа / Под ред. А.В. Рылькова. – Тюмень: Западно-Сибирский НИГНИ, 1977. – 122 с.
7. Практикум по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во МГУ, 1976. – 307 с.
8. РД 52.18.647-2003. Методические указания определение массовой доли нефтепродуктов в почвах. Методика выполнения измерений гравиметрическим методом / Разр. «Тайфун». Утв. Росгидрометом 18.03.2003. Введен. 01.06.2003. – 16 с.
9. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. – М.: Колос, 1993. – 175 с.
10. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. – М.: Наука, 2005. – 252 с.
11. Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surface active agents from two *Bacillus* species // Appl. Environ. Microbiol. – 1987. – V. 53, N 2. – P. 224-229.
12. El Fantroussi S., Agathos S. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? // Curr. Opin. in Microbiol. – 2005. – V. 8, N 3. – P. 268-275.
13. Goodfellow M., Minikin D.E. The genera *Nocardia* and *Rhodococcus*. The Prokaryotes. A Handbook on habitats, isolation and identification of bacteria / Eds. Starr P. et al. – Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1981. – V. 2. – P. 2016-2027.
14. Jansson J.K., Björklöf K., Elvang A.M., Jørgensen K.S. Biomarkers for monitoring efficacy of bioremediation by microbial inoculants // Environ. Poll. – 2000. – V. 107. – P. 217-223.
15. Mishra S., Jyot J., Kuhad R.C., Lal B. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil // Appl. and Environ. Microbiol. – 2001. – V. 67, N 4. – P. 1675-1681.
16. Ouchterlony O., Nilsson L.-A. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis // Handbook of experimental immunology. V. I. Immunochemistry / Ed. Weiz D.M. – Oxford: Alden Press, 1979. – P. 19-33.
17. Ouyang W., Liu H., Murygina V., Yu Y., Xiu Z., Kalyuzhnyi S. Comparison of bio-augmentation and composting for remediation of oily sludge: A field-scale study in China // Process Biochem. – 2005. – V. 40. – P. 3763-3768.