

УДК 579.6

UDC 579.6

**НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИЙ ШТАММ
RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS B2 КАК
ОСНОВА СОЗДАНИЯ БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ
ЛИКВИДАЦИИ УГЛЕВОДОРОДНЫХ ЗА-
ГРЯЗНЕНИЙ И РЕКУЛЬТИВАЦИИ ЗЕМЕЛЬ**

**OIL- DEGRADING STRAIN *RHODOCOCCLUS
ERYTHROPOLIS B2* AS A BASE OF BIOPREP-
ARATION USED FOR ELIMINATION OF HY-
DROCARBON CONTAMINATES AND SOIL
RECUULTIVATION**

Карасёва Эмма Викторовна
к.б.н., профессор

Karaseva Emma Viktorovna
Cand.Biol.Sci., professor

Волченко Никита Николаевич
к.б.н.

Volchenko Nikita Nikolaevich
Cand.Biol.Sci.

Худокормов Александр Александрович
к.б.н.

Khudokormov Alexander Alexandrovich
Cand.Biol.Sci.

Самков Андрей Александрович
к.б.н.

Samkov Andrey Alexandrovich
Cand.Biol.Sci.

Карасёв Сергей Геннадьевич
к.б.н.

Karasev Sergey Gennadievich
Cand.Biol.Sci.

Батина Елена Владимировна
аспирант

Batina Elena Vladimirovna
postgraduate student

Самкова Светлана Михайловна
аспирант
*Кубанский государственный университет,
Краснодар, Россия*

Samkova Svetlana Mikhailovna
postgraduate student
Kuban State University, Krasnodar, Russia

В статье рассмотрены биотехнологические свой-
ства нефтеокисляющего штамма *Rhodococcus
erythropolis B2*, позволяющие использовать его
как основу для биопрепарата: деструктивный по-
тенциал по отношению к углеводородам, характе-
ристики роста на различных средах, продукция
фитогормонов и биоПАВ, адгезивная и флотаци-
онная активность, испытания в лабораторный и
полевых условиях

This article is devoted to the biotechnological proper-
ties of the oil-degrading strain *Rhodococcus
erythropolis B2*, which allow us to use microorgan-
ism B2 as a base of biopreparation: hydrocarbon-
destructive potential, growth characteristics on the
different media, producing phytohormones and bio-
surfactants, adhesive and floatation activity, and also
laboratory and field tests

Ключевые слова: БИО-ПАВ, БИОРЕМЕДИА-
ЦИЯ, НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИЕ АКТИНОМИЦЕ-
ТЫ, ФИТОГОРМОНЫ, БИОПРЕПАРАТ

Keywords: BIOSURFACTANTS,
BIOREMEDIATION, OIL DEGRADING
ACTINOMYCETES, PHYTOHORMONES,
BIOPREPARATION

В статье рассмотрены биотехнологические свойства нефтеокисляю-
щего штамма *Rhodococcus erythropolis B2*, позволяющие использовать его
как основу для биопрепарата: деструктивный потенциал по отношению к
углеводородам, характеристики роста на различных средах, продукция фи-
тогормонов и биоПАВ, адгезивная и флотационная активность, испытания
в лабораторный и полевых условиях

Современные технологии биоремедиации во многом базируются на применении бактерий-деструкторов, способных катаболизировать поллютанты. Эти микроорганизмы служат основой для создания биопрепаратов. Таким образом, уникальные углеводородоокисляющие штаммы, технологии их культивирования для промышленных масштабов и методы применения на местности составляют основу современной микробной экобиотехнологии. В ликвидации углеводородных загрязнений всё большее значение приобретают микроорганизмы рода *Rhodococcus*, способные к деградации широкого спектра соединений, продукции ценных метаболитов [1]. Представители рода доминируют в углеводородоокисляющих микробиоценозах углеводородзагрязненных почв [2]. Описана возможность продукции микроорганизмами данной группы фитостимуляторов индольной природы [3]. Это обуславливает перспективы использования родококков в качестве основы новых нефтеокисляющих препаратов с расширенными свойствами.

Целью данной работы является комплексное описание углеводородоокисляющей бактерии *Rhodococcus erythropolis* В2 с целью выяснения возможности совместного присутствия комплекса технологически важных свойств, для обоснования использования штамма как основы для создания биопрепарата-нефтедеструктора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования - штамм *Rhodococcus erythropolis* В2 (ВКМ Ас-2017 D) выделен из нефтезагрязненного почвогрунта Западной Сибири (ОАО "Когалымнефтегаз"). Хранится в рабочей коллекции кафедры микробиологии, депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ). Непатогенность культуры подтверждена в остром опыте на мышах. Систематическое положение – принадлежит к филуму *Actinobacteria* (грамположительные с высоким содержанием ГЦ-пар в ДНК), подпорядку *Corynebacterineae*). По морфологическим характеристикам проявляет клас-

сический для родококков цикл “кокк-палочка-кокк”, отмечалось периодическое формирование рудиментарного мицелия. Хемотаксономические признаки: содержит диагностическую аминокислоту мезо-ДАПК, пептидогликан поперечносвязанный типа A1 γ . Менахиноны типа МК-8 (H₂). Содержит стандартные родомиколовые кислоты, что определялось методом тонкослойной хроматографии в сравнении с контрольным штаммом. Видовая идентификация проведена молекулярно-генетическим методом по полной последовательности гена 16s рРНК.

Для поддержания культур, наработки биомассы клеток и количественных учетов использовали плотную питательную среду – питательный агар (ПА) стандартного состава. Для наращивания биомассы клеток, а также исследования биодеструкции нефтепродуктов в условиях жидких культур использовали жидкую минеральную среду следующего состава (минимальную среду): нитрат калия – 4,0 г, однозамещенный фосфат калия – 0,6 г, двузамещенный фосфат натрия (двенадцативодный) – 1,4 г, сульфат магния – 0,8 г, вода дистиллированная 1 л, раствор микроэлементов стандартный №17 – 1 мл. В качестве субстрата использовали сахарозу, гексадекан или нефтепродукты из ряда: дизельное топливо, нефть, мазут, вносимые в среду в необходимом количестве в зависимости от целей культивирования. Для качественного определения деструкции индивидуальных алканов использовали агаризованную среду того же состава [4].

Культивирование на жидких питательных средах осуществлялось в колбах 100-500 мл на орбитальных качалках при частоте вращения 100-200 об/мин при комнатной температуре, либо аппарате культивирования АК-210 (10 л), либо в ферментационном комплексе ОКА-01-100Г (100 л) производства Института биологического приборостроения РАН (г. Пущино).

Определение показателя гидрофобности клеток (ПГ) осуществляли по модифицированной Серебряковой с соавторами [5] методике Розенберга [6].

Измерение концентрации биомассы при культивировании на жидкой питательной среде проводили гравиметрическим методом по усовершенствованной авторами методике Brown для определения абсолютно сухого веса (АСВ) биомассы [7].

Концентрацию нефтепродуктов определяли гравиметрическим, а также флуоресцентным методами. Определение концентрации нефтепродуктов флуоресцентным методом осуществляли согласно ПНД Ф 16.1.21-98 по КХА “Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в пробах почв на анализаторе жидкости “Флюорат-02””. Гравиметрическим методом- в соответствии с методическими указаниями [8] через экстракцию хлороформом либо гексаном нефтепродуктов из пробы, с последующим гравиметрическим окончанием.

Продуцирование индольных соединений бактериями определяли колориметрическим методом с помощью реактива Сальковского.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Перспективность микроорганизма как биотехнологического агента детерминирована набором его специфических физиолого-биохимических свойств. Для штамма-нефтедеструктора это прежде всего способность интенсивно катаболизировать углеводороды нефти, широта спектра их потребления, возможность экономически оправданного масштабирования наработки биомассы, синтез биоПАВ и другие свойства.

Спектр потребления отдельных фракций углеводородов представлен в таблице 1.

Таблица 1. Степень утилизации отдельных фракций углеводородов

Концентрация углеводородного субстрата	Степень утилизации (%)							
	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈
0,1%	33	32	31	43	65	100	98	96
10%	13	12	21	49	55	67	69	73

Как видно из таблицы 1, микроорганизм активно потребляет основные фракции алканов при различных исходных концентрациях (в диапазоне концентраций от 0,1 до 10%), при этом степень деструкции составляет от 12 до 100% (в контроле – 1-7%). Высокая эффективность штамма была обнаружена также при утилизации ароматических моно- и полициклических углеводов, а также ряда коммерческих нефтепродуктов и сырых нефтей [9].

Одним из технологически-важных свойств нефтеокисляющих микроорганизмов является уровень гидрофобности клеточной стенки микроба. Её липофильные свойства обусловлены высоким содержанием гликолипидов, обеспечивающих контакт клетки с каплями нефтепродуктов, их диффузию к оксидазам цитоплазмы. Показатель гидрофобности штамма *Rhodococcus erythropolis* В2, а также других родококков штаммоспецифично зависел от продолжительности культивирования, источника среды и других факторов (см. рисунок 1).

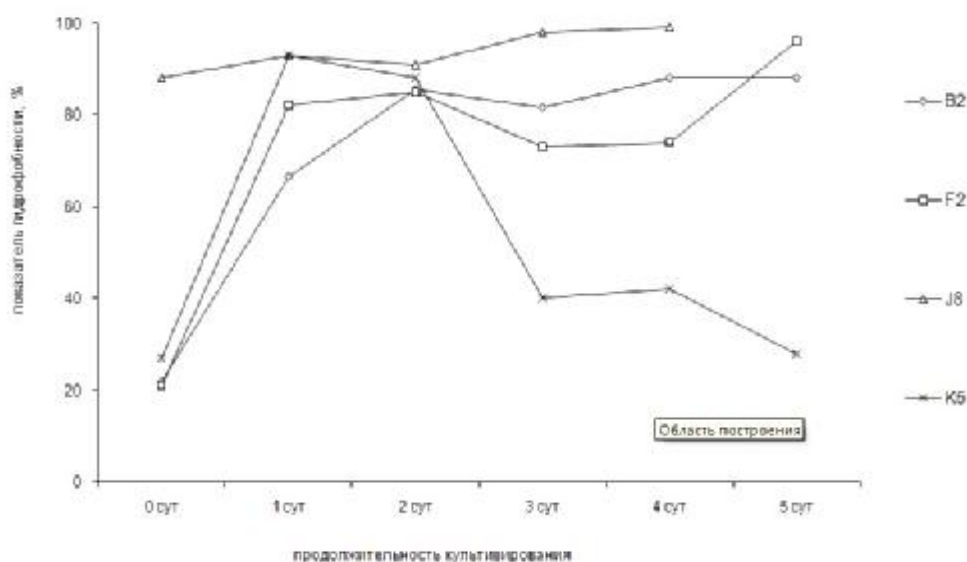


Рисунок 1. Динамика показателя гидрофобности клеток нефтеокисляющих бактерий в процессе роста на жидкой минеральной среде с гексадеканом

Как видно из рисунка 1, клетки штамма В2 исходно, вне контакта с углеводородом гидрофильны (около 20%), что удобно с точки зрения тех-

нологических манипуляций с биомассой. При контакте с нефтепродуктами гидрофобность клеток повышается до 80%, что обеспечивает эффективное поглощение и ассимиляцию субстрата.

Важным свойством промышленного штамма является его способность расти на несложных, недорогих питательных средах, поскольку стоимость среды во многом определяет конечную рентабельность производства. На уровне лабораторных экспериментов из плотных питательных сред оптимальной был выбран питательный агар, из жидких – минимальная минеральная среда с углеводородом. На основе последней было исследовано влияние типа источника азота на рост штамма В2 (таблица 2). Показано, что уровень деструкции дизельного топлива и нефти не зависит от источника азота, многократно превышая уровень в контроле, равный 1-3%.

Таблица 2 - Влияние источника азота на степень утилизации (%) различных концентраций нефти и мазута

Дизельное топливо				Нефть			
1%	5%	1%	5%	1%	5%	1%	5%
NH ₄ ⁺		NO ₃ ⁻		NH ₄ ⁺		NO ₃ ⁻	
89	88	93	93	82	84	83	83

Экономически целесообразное масштабирование наработки биомассы штамма В2 требовало разработки оптимальной среды культивирования. Предыдущие исследования показали, что водные вытяжки минеральных удобрений представляют собой экономически эффективную альтернативу минеральным средам. Сравнение выхода биомассы при росте на разных минеральных средах, а также водных вытяжках из минеральных удобрений выявило максимальную продукцию клеточной биомассы, обладающей необходимыми свойствами, при росте на осветленной вытяжке из комплексного минерального удобрения нитроаммофоска (ГОСТ 19691-84, марка А), взятого в оптимальной концентрации. В дальнейшем, данное решение бы-

ло использовано при подготовке минеральной основы среды при культивировании на биотехнологическом комплексе ОКА-01-100Т.

Одним из подходов к повышению эффективности биопрепаратов-нефтедеструкторов является переход от монобактериальных к полибактериальным препаратам. Включение нескольких штаммов обеспечивает расширение спектра окисления, большую вариабельность биоагента в различных условиях применения. Была исследована возможность совместного роста *Rh. erythropolis* В2 с другими штаммами нефтеокисляющих бактерий в условиях жидкофазного культивирования на среде с гексадеканом. Минеральная среда с гексадеканом в качестве единственного источника углерода и энергии была инокулирована бинарными сочетаниями В2 с другими штаммами актинобактерий, а также их монокультурами. На рисунке 2 приведены посуточные динамики оптической плотности ($\lambda=670$ нм) жидких культур, выращиваемых в качалочных колбах.

Как видно из рисунка 2, ни в одном случае не наблюдалось подавления роста в смешанной культуре относительно обеих монокультур, что свидетельствует об отсутствии резких конкурентных взаимоотношений. В сочетании “В2+F5” отмечено увеличение более чем в 1,5 раза концентрации клеток, чем в монокультурах, что может свидетельствовать о наличии элементов симбиотических взаимоотношений, требующих дальнейших исследований.

Создание биопрепарата предполагает поэтапное масштабирование его культивирования. Приведённые выше результаты были получены в объёмах бактериальных культур 50-500 мл (колбы на орбитальной качалке), выборочно проверены на лабораторном ферментёре в объёме 8-10 л. Переход к пилотным испытаниям как научной базы для производственного уровня был осуществлён на базе биотехнологического комплекса ОКА-01-100Т. При масштабировании роста бактерий за счёт нелинейного изменения процессов массопереноса кислорода и питательных субстратов могут

значительно поменяются ростовые характеристики культуры. Поэтому основное внимание уделяли кинетическим показателям в сравнении с эталонными опытами в объемах качалочных колб.

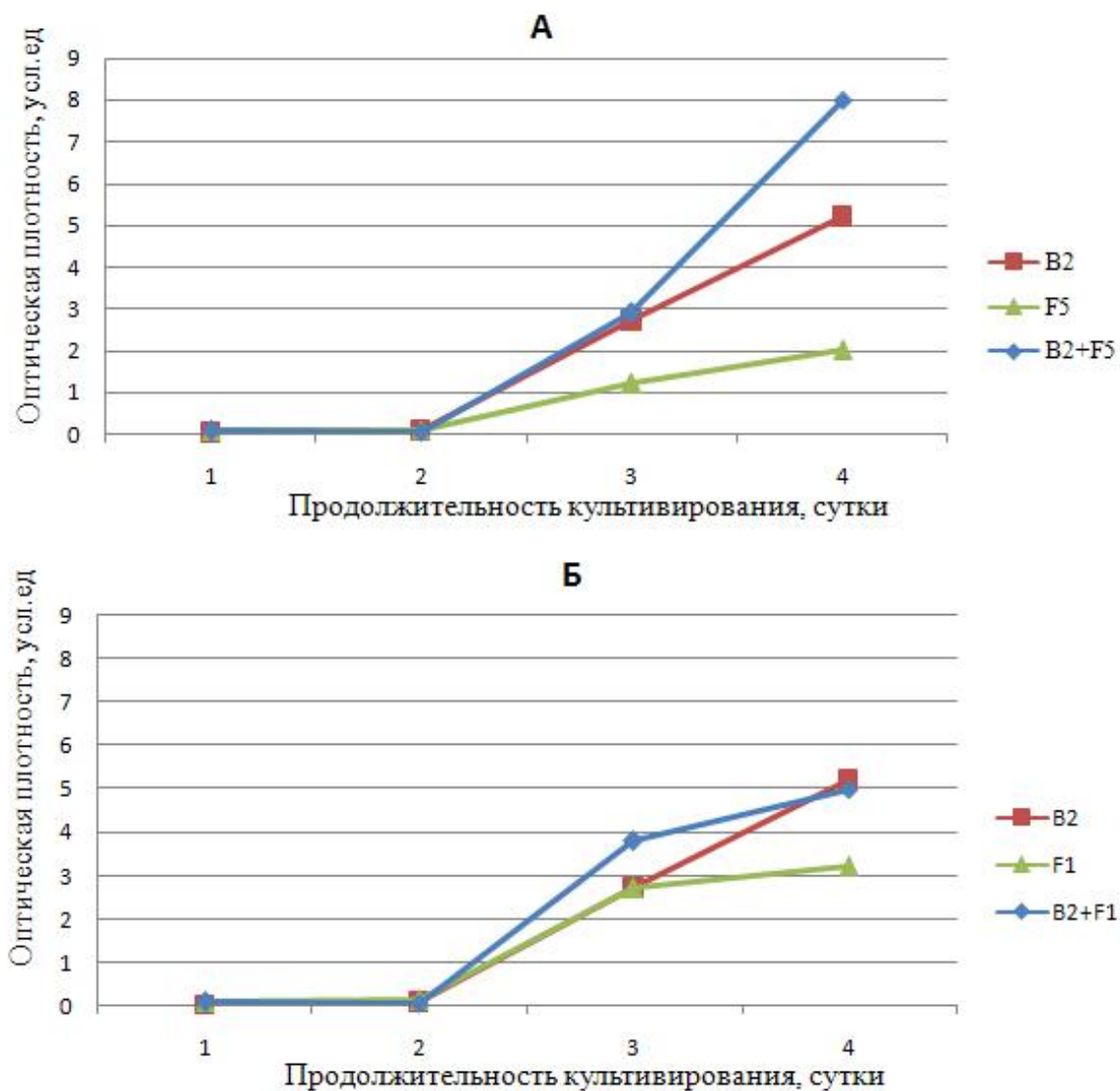


Рисунок 2. Рост *Rh. erythropolis* B2 в монокультуре и в бинарных культурах с алканотрофными актинобактериями: фигура А – *Rh. erythropolis* B2 и *Rhodococcus sp.* F5, фигура Б – *Rh. erythropolis* B2 и *Rhodococcus erythropolis* F1

Предварительно была исследована эффективность роста родококка на жидкой минеральной среде с сахарозой в качестве единственного источника углерода и энергии. Было обнаружено, что штамм В2 обладает большей эффективностью роста относительно других исследованных штаммов, хотя и меньшей чем при ассимиляции гексадекана.

Периодическое культивирование в объёме 90 л осуществляли с целью определения отдельных кинетических параметров роста родококков, выявления сроков выхода культуры в стационарную фазу для сокращения продолжительности ферментации. В качестве минеральной основы питательной среды использовали водную вытяжку нитроаммофоски (соотношение N:P:K - 1:1:1), источником углерода служила сахароза в концентрации 10 г/л. Пробы отбирались в течение 62 ч с периодичностью в 2 часа - определение оптической плотности ($\lambda=670$ нм), концентрации биомассы, рН; каждые 12 часов – концентрация сахарозы, титр клеток (КОЕ/мл). Кривые роста по оптической плотности и биомассе приведены на рисунке 3. Динамика титра клеток и снижения концентрации сахарозы – в таблице 3.

Был получен устойчивый рост культуры, продолжительность лаг-фазы составляла 18 ч, что свидетельствует об относительно продолжительном периоде адаптации клеток. Отмеченные 2 фазы экспоненциального роста были обусловлены колебанием уровня кислотности среды.

Как следует из таблицы 3, в течение 62 ч культивирования произошло увеличение титра клеток на 3 порядка и утилизация сахарозы на 81%. Учитывая, что применялась максимально упрощенная, не сбалансированная по рН минимальная среда и неуглеводородный источник углерода, данные результаты свидетельствуют о перспективности применённой методики.

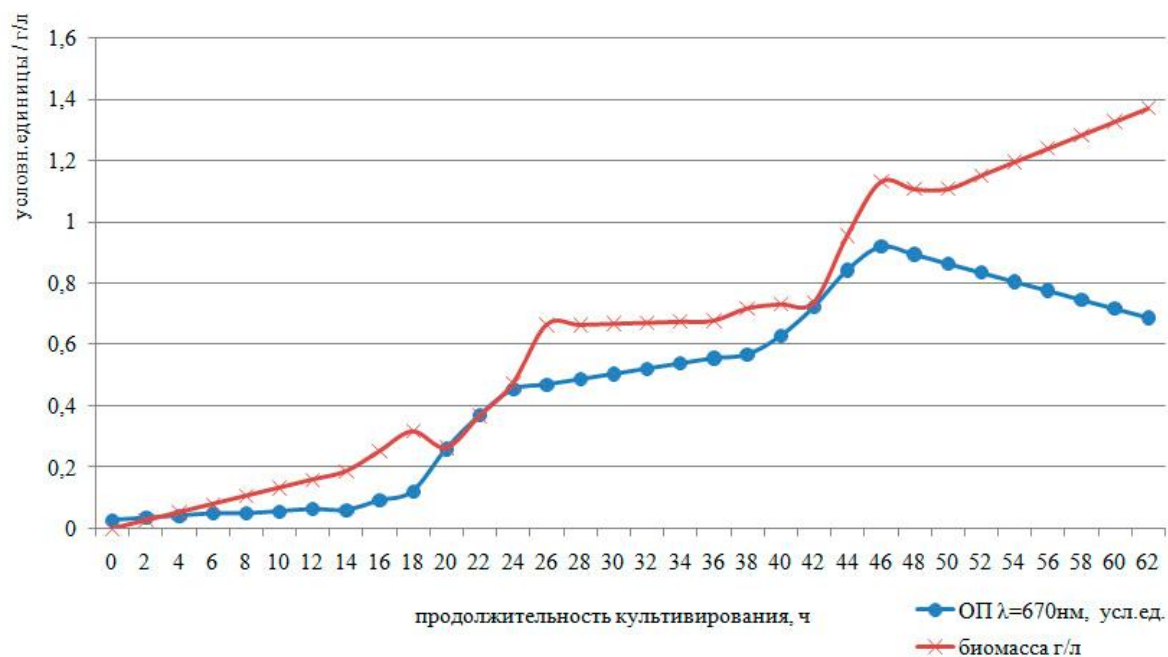


Рисунок 3. Кривые роста *Rh. erythropolis* B2 при периодическом культивировании на биотехнологическом комплексе ОКА-01-100Т ИБП РАН

Таблица 3. Титр клеток и концентрация сахарозы в среде роста при культивировании на ОКА-01-100Т

Продолжительность культивирования, ч	Титр клеток, КОЕ/мл	Концентрация сахарозы, г/л
0	$5,5 \cdot 10^6$	10
12	–	7,98
24	$4,0 \cdot 10^7$	3,85
36	$1,8 \cdot 10^8$	3,42
48	–	2,74
62	$2,0 \cdot 10^9$	1,88

На основании приведённых выше результатов был рассчитаны некоторые характеристики роста микроорганизмов (Таблица 4).

При культивировании в ферментёре была достигнута более высокая удельная скорость роста, сравнимая с литературными данными для родококков в схожих условиях [10].

Таблица 4. Характеристики роста *Rh. erythropolis* В2 в зависимости от среды, метода культивирования и периода роста

Метод культивирования, среда роста, углеродный субстрат	Удельная скорость роста μ , ч ⁻¹ (час роста)	Продолжительность генерации, ч	Выход биомассы, г/л
Качалочные колбы, жидкая минеральная среда с гексадеканом	0,147 ч ⁻¹ (24-36 ч)	4,7 ч	3,86
ОКА-01-100Т, вытяжка нитроаммофоски с сахарозой	0,378 ч ⁻¹ (18-20 ч)	1,8	0,26 (20 ч)
	0,06 ч ⁻¹ (42-46 ч)	11,6	1,13 (46 ч)

В биотехнологическом цикле одним из энергоёмких и затратных этапов производства является стадия концентрирования клеток, отделения их от водной фазы. В качестве способа первичного концентрирования мы исследовали флотацию, широко применяемую в дрожжевых производствах, но менее изученную при работе с нефтеокисляющими родококками. Способность актинобактерий к естественной флотации обусловлена наличием в клеточной стенке липидов, в том числе биосурфактантов. Это вызывает как адгезию клеток к флоатирующим частицам жидкости или газа, так и малый удельный вес влажной биомассы. Было обнаружено, что гидрофобность клеток, выросших на среде с сахарозой значительно ниже (менее 20%), чем на среде с углеводородом (более 80%). Проведена сравнительная оценка как естественной флотации клеток в среде, так и под воздействием различных способов стимуляции – обработкой клеток растительными маслом, гексадеканом, барботаж клеточной суспензии, изменение её кислотности и др. При естественной флотации 80-90% клеток в течении 1 ч. удерживалось во взвешенном состоянии (нефлотировавшие клетки). Обработка углеводородами и маслом в концентрации приводила к снижению этой цифры до 40% и менее. Барботирование культуры воздухом снижала количество остающейся в суспендированном состоянии кле-

точной биомассы до величины 30% от исходной, что соответствует эффективности работы промышленных флотаторов. Таким образом, комбинируя различные методы, был достигнут уровень удаления до 90% клеток из среды роста.

Внедрение “зелёных” технологий в сельском хозяйстве предполагает к минимизации химической активизации роста растений. Одним из перспективных путей считается применение PGPR-бактерий, способных стимулировать рост растений. Как правило, это представители родов *Pseudomonas*, *Azospirillum* и др., выделяющих фитогормоны. Ранее нами было показано снижение фитотоксичности загрязненной нефтью почвы при обработке культурой *R. erythropolis* B2 [11]. , Обнаружена продукция ею индолуксусной кислоты (ИУК). Максимальный выход ауксина был получен при внесении в минимальную среду культивирования триптофана, как предшественника в биосинтезе ауксина – уровень продукции повышался с 9 мкг/мл до 31 мкг/мл. Положительная зависимость роста продукции ИУК от увеличения концентрации триптофана наблюдалась при культивировании на гексадекане. Способность родококков выделять фитостимуляторы при деструкции углеводов открывает возможности для их использования как фитостимулирующих культуры при рекультивации нефтезагрязненных почв и фиторемедиационном этапе очистки различных нефтесодержащих отходов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Штамм *Rhodococcus erythropolis* B2 наряду с другими перспективными нефтеокисляющими микроорганизмами коллекции кафедры генетики, микробиологии и биотехнологии КубГУ исследовался как нефтеструктор. В предыдущих исследованиях показана его эффективность при биоремедиации почв [12] , нефтешламов [11, 13], как в лабораторных, так и полевых условиях [14]. Нефтеокисляющий штамм *Rhodococcus*

erythropolis B2 по сумме физиологических и технологических свойств имеет преимущества в качестве основы для создания биопрепарата-нефтедеструктора на основании следующих основных выявленных свойств:

- широкий спектр катаболизируемых углеводов, высокая деструкционная активность по отношению к различным нефтепродуктам и нефти;
- высокая удельная скорость роста при культивировании на дешевом сырье;
- возможность совместного культивирования с другими штаммами алканотрофных актинобактерий при наработке полибактериального препарата (ассоциативной культуры);
- способность к синтезу фитостимулирующих соединений индольной природы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Robert van der Geize, Lubbert Dijkhuizen. Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications // *Current Opinion in Microbiology*.-2004.-Vol.7, Issue 3.- P.255-261
2. Bell K.S., Philp J.C., Aw D.W.J., Christophi N. The genus *Rhodococcus* // *Journal of Applied Microbiology*.-1998.-Vol.85.-P.195-210.
3. Цавкелова Е. А. Чердынцева Т. А., Нетрусов А. И. Образование ауксинов бактериями, ассоциированными с корнями орхидей // *Микробиология*. -2005. -Т. 74, № 1.-С. 55-62.
4. Мельников Д.А., Гирич И.Е., Карасева Э.В. Спектры потребляемых углеводов у гетеротрофных бактерий, выделенных на различных средах из чернозема, загрязненного Тенгизской нефтью // *Полиматический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета*. -2005.- №10. -С. 187-197.
5. Серебрякова Е.В., Дармов И.В., Медведев Н.П., Алексеев С.А., Рыбак С.И. Оценка гидрофобных свойств бактериальных клеток по адсорбции на поверхности капель хлороформа // *Микробиология*.- 2002.- т.71.- №2.- С. 237-239.
6. Stratton H.M., Brooks P.R., Griffiths, Seviour R.J. Cell surface hydrophobicity and mycolic acid composition of *Rhodococcus* strains isolated from activated sludge foam // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*.-2002.-№28.-P.264-267.
7. Brown W.A., Punchik R., Cooper D.G. Determining biomass from differential total organic carbon // *Biotechnology Techniques*.-1997.-Vol.11.-№3.-P.213-216.
8. Сборник методик и инструктивных материалов по определению вредных веществ для контроля источников загрязнения окружающей среды.-Часть. VII.-Краснодар. 1997. 184 с.

9. Мельников Д.А. Распределение признаков биodeградации углеводов и оценка технологически важных свойств нефтеокисляющих бактерий: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Кубанский государственный университет. Краснодар, 2005
10. Петриков К.В. Биологические поверхностно-активные вещества, продуцируемые микроорганизмами-нефтедеструкторами родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*: автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук / МГУ. Москва, 2011
11. Волченко Н.Н., Карасёва Э.В. Скрининг углеводородокисляющих бактерий - продуцентов поверхностно-активных веществ биологической природы и их применение в опыте по ремедиации нефтезагрязненной почвы и нефтешлама // Биотехнология. -2006. -№ 2. -С. 57-62.
12. Карасева Э.В., Гирич И.Е., Худокормов А.А., Алешина Н.Ю., Карасёв С.Г. Биоремедиация черноземной почвы, загрязненной нефтью // Биотехнология. -2005. - № 2. -С. 67-72.
13. Данилец В.М., Карасева Э.В., Самков А.А., Самкова С.М., Худокормов А.А., Алешина Н.Ю., Калитка С.А., Карпов В.Г. Комплексная биотехнология ликвидации и рекультивации накопителей опасных отходов в инфраструктуре нефтеперерабатывающего предприятия // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. -2011. -№ 8. -С. 13-20.
14. Карасева Э.В., Худокормов А.А., Самков А.А., Карасев С.Г., Волченко Н.Н. Биологическая реабилитация земель, загрязненных нефтепродуктами, в условиях южного федерального округа // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. -2006. -Т. 2. -№ 4. -С. 47-48.