

УДК 579.6

UDC 579.6

ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДА НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ТЯЖЁЛЫМ МЕТАЛЛАМ ШТАММОВ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ АКТИНОБАКТЕРИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ПРОЦЕССАХ БИОРЕМЕДИАЦИИ

EFFECTS OF CARBON SOURCE TO RESISTANCE OF HEAVY METALS OF OIL-DESTRUCTIVE STRAINS ACTINOBACTERIA USED FOR BIOREMEDIATION

Худокормов Александр Александрович
к.б.н.

Khudokormov Alexander Alexandrovich
Cand.Biol.Sci.

Карасёва Эмма Викторовна
к.б.н., профессор

Karaseva Emma Viktorovna
Cand.Biol.Sci.

Самков Андрей Александрович
к.б.н.

Samkov Andrey Alexandrovich
Cand.Biol.Sci.

Волченко Никита Николаевич
к.б.н.

Volchenko Nikita Nikolaevich
Cand.Biol.Sci.

Карасёв Сергей Геннадьевич
к.б.н.

Karasev Sergey Gennadievich
Cand.Biol.Sci.

Батина Елена Владимировна
аспирантка
Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия

Batina Elena Vladimirovna
postgraduate student
Kuban State University, Krasnodar, Russia

Исследована устойчивость 8 штаммов нефтеокисляющих актиномицетов, выделенных из нефтезагрязнённых экосистем, к солям тяжёлых металлов при культивировании с использованием различных источников углерода. Изучена возможность их использования при биоремедиации нефтезагрязнённых объектов, содержащих тяжёлые металлы

We studied the resistance of the eight strains of oil-destructive actinomycetes, isolated from the oil-contaminated ecosystems to heavy metal salts when cultivatiwng with different carbon sources. Furthermore we researched feasibility to use those microorganisms for bioremediation of oil- contaminated sites with high level of heavy metals

Ключевые слова: ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ, БИОРЕМЕДИАЦИЯ, НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИЕ АКТИНОМИЦЕТЫ, БИОПРЕПАРАТ

Keywords: HEAVY METALS, BIOREMEDIATION, OIL OXIDIZING ACTINOMYCETES, BIOPREPARATION

Из множества различных углеводородных контаминаций первое место по праву занимают нефтешламы, представляющие собой продукты длительного хранения нефти и нефтепродуктов с преобладанием тяжёлых фракций углеводородов, которые существенно усложняют процесс микробиологической детоксикации загрязнённого объекта. Дополнительную трудность для процесса биоремедиации представляют, содержащиеся в нефтешламах тяжёлые металлы. Ранее показано, что металлы могут замедлять или полностью подавлять рост микроорганизмов, вследствие повреждения какой-либо одной метаболической функции или сразу нескольких [1]. Степень ингибирования зависит от вконцентраций, влияющих на рост

факторов. При концентрациях ингибитора не приводящих к гибели клеток происходит изменение биологического состава микробной биомассы, кинетических характеристик культуры и появление физиологических типов, устойчивых к действию ядов [2, 3] Известно, что часть тяжёлых металлов, содержащиеся в нефтешламах, такие, как медь, цинк, кобальт, никель, железо, в наномолярных концентрациях необходимы для жизнедеятельности микроорганизмов, но в микро- и миллимолярных концентрациях являются токсичными для них. Другие же металлы (ртуть, кадмий) оказывают ингибирующее воздействие на микроорганизмы даже в миллимолярных концентрациях [4].

Цель настоящей работы – изучить устойчивость к железу, никелю, меди, цинку, кобальту, свинцу, ртути и кадмию некоторых штаммов нефтеокисляющих актиномицетов при использовании различных углеводов в качестве источника углерода. А также проследить за изменением нефтеокисляющей активности в зависимости от присутствия тяжёлых металлов в среде. Полученные данные будут использованы в процессах биоремедиации, а также при создании регионально адаптированных нефтеокисляющих препаратов

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали штаммы нокардиоморфных актиномицетов, выделенные из нефтешламов и нефтезагрязнённых почв Краснодарского края, находящихся в коллекции кафедры генетики и микробиологии Кубанского госуниверситета (*Rhodococcus erythropolis*. F1, *Rhodococcus erythropolis* B2, *Arthrobacter* sp. N15, *Gordonia* sp. K6, *Micrococcus* sp. 25, *Rhodococcus* sp. J8, *Rhodococcus* sp. 45, *Rhodococcus* sp. 1167). Идентификацию бактерий проводили согласно определителю Берги 9 издание [11]. Данные штаммы обладают характеристиками, позволяющими использовать их в процессах биоремедиации, а также создать на их основе серию

регионально адаптированных нефтеокисляющих биопрепаратов для реабилитации экосистем, загрязнённых нефтепродуктами.

При выращивании бактерий для определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) металлов использовали плотную минимальную среду [12] с добавлением в качестве единственного источника углерода и энергии 1% сахарозы, дизельного топлива, нефти или мазута в зависимости от условий эксперимента. Для изучения влияния МИК на степень деструкции углеводов использовали минеральную жидкую среду с углеводородами [12]. Для эксперимента были взяты следующие металлы, наиболее часто встречающиеся в нефтешламах: Cd(III), Cu(II), Zn(II), Ni(II), Pb(II), Hg(II), Co(II), Fe(III). Исследуемые штаммы бактерий выращивали в условиях глубинного культивирования при 25°C на круговых качалках (150 об/мин) в качалочных колбах объёмом 250 мл с 50 мл питательной среды. В качестве посевного материала использовали трёхсуточные монокультуры, полученные на мясо – пептонном бульоне. Количество остаточных углеводов определяли путем их экстракции гексаном с последующим измерением в анализаторе жидкости флюорат 02-3 М и гравиметрически.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значительные успехи достигнуты в изучении резистентности к тяжелым металлам при использовании легко метаболизируемых источников углерода (глюкоза, сахароза, пируват) [5, 6, 7]. А также при оценке токсического воздействия тех или иных металлов на почвенное микробное сообщество [8, 9, 10]. Однако, опираясь на эти работы нельзя с уверенностью сказать о степени устойчивости к тяжелым металлам отдельных штаммов актиномицетов, часто используемых в процессе очистки углеводородзагрязнённого объекта. В ходе биологической детоксикации нефтешламов также возникает вопрос об устойчивости применяемых в очистке штаммов бактерий к тяжелым металлам в зависимости от углеводородного субстра-

та. В качестве объекта исследования нами были отобраны 8 штаммов актиномицетов, относящихся к различным таксономическим группам, обладающих наибольшей нефтеокисляющей активностью и успешно используемых в биоремедиации.

При определении МИК тяжёлых металлов источниками углерода служили: сахара, как наиболее доступный субстрат, а также различные углеводороды, которые являются наиболее распространёнными поллютантами. Наибольшей устойчивостью к тяжёлым металлам обладают микроорганизмы, принадлежащие к роду *Rhodococcus* (рис. 1-5).

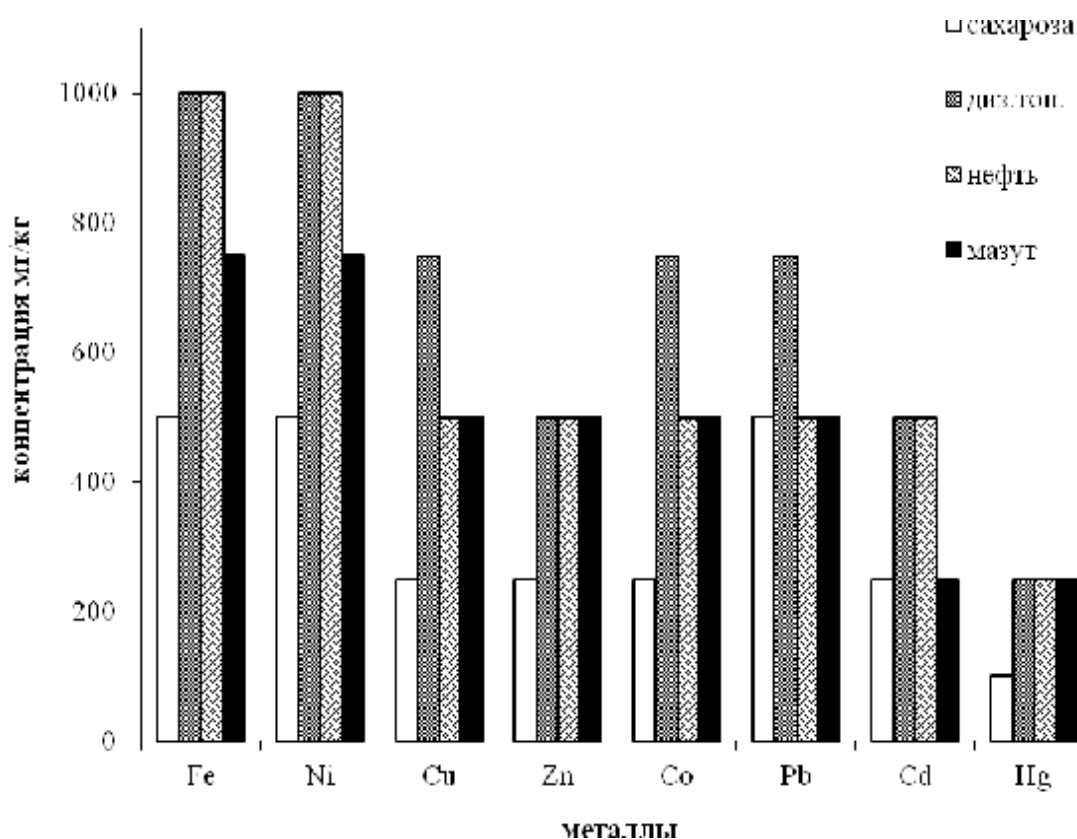


Рис.1. Изменение МИК металлов при культивировании штамма *Rhodococcus erythropolis. F1* на различных источниках углерода

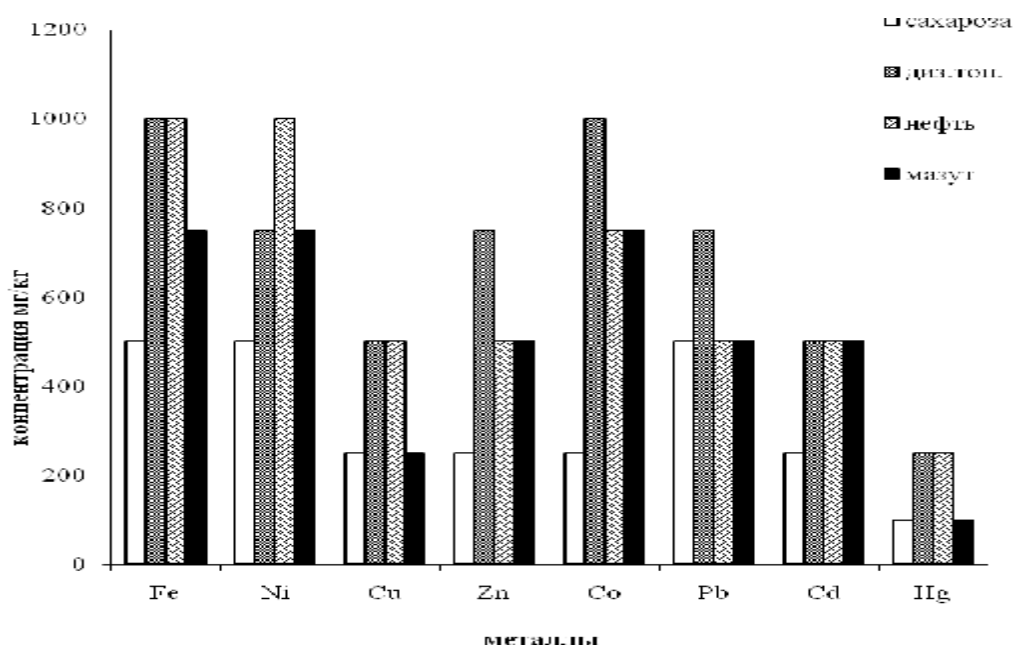


Рис.2. Изменение МИК металлов при культивировании штамма *Rhodococcus erythropolis* B2 на различных источниках углерода

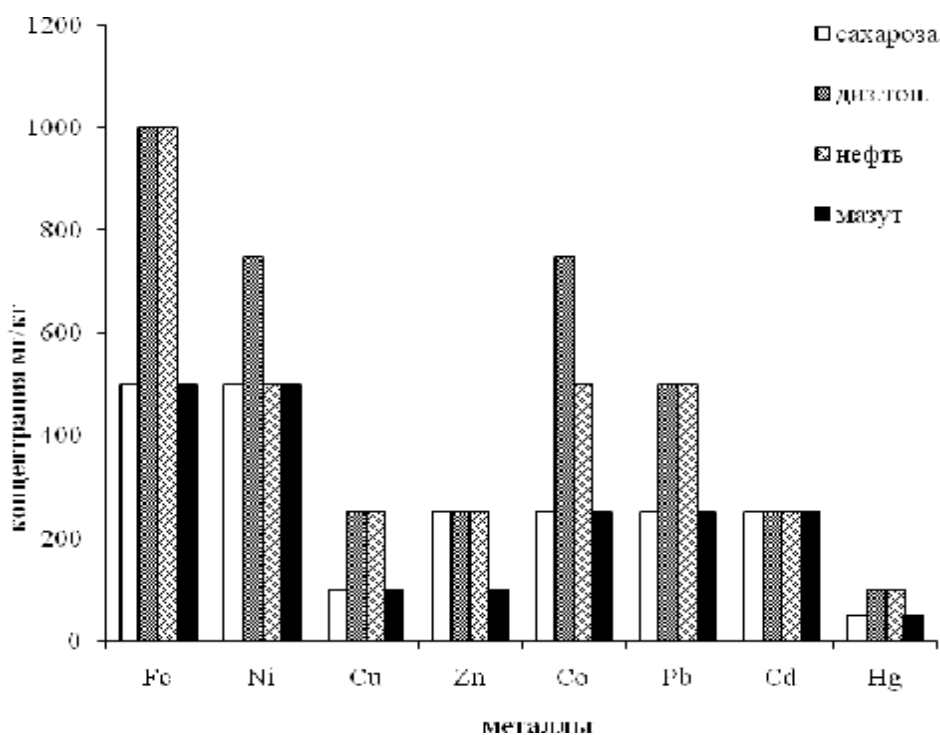


Рис.3. Изменение МИК металлов при культивировании штамма *Rhodococcus* sp. J8 на различных источниках углерода

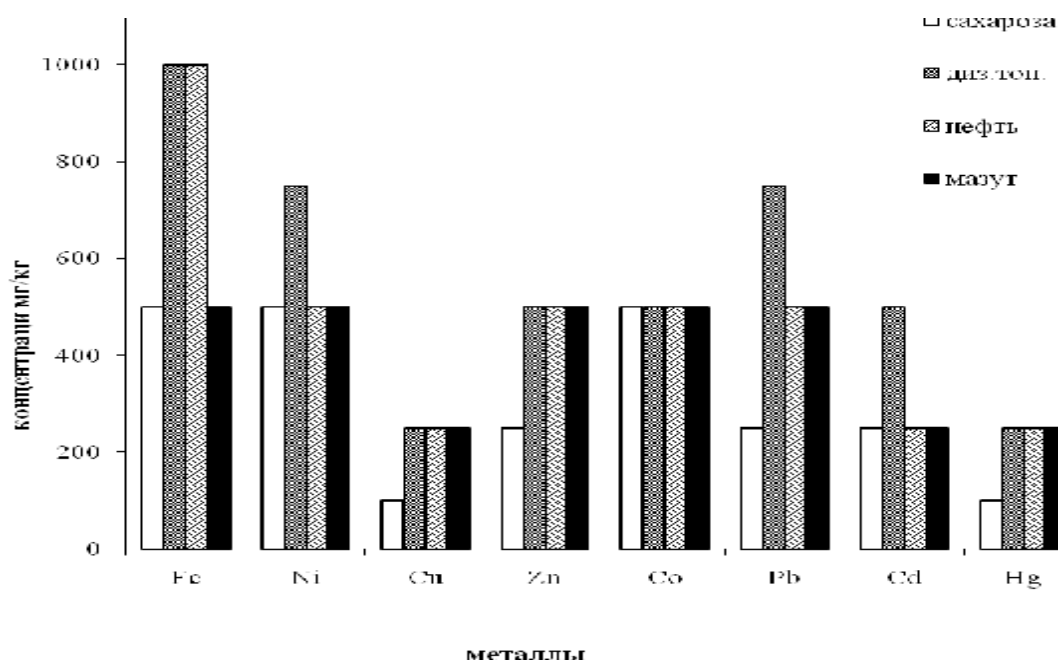


Рис.4. Изменение МИК металлов при культивировании штамма *Rhodococcus sp. 45* на различных источниках углерода

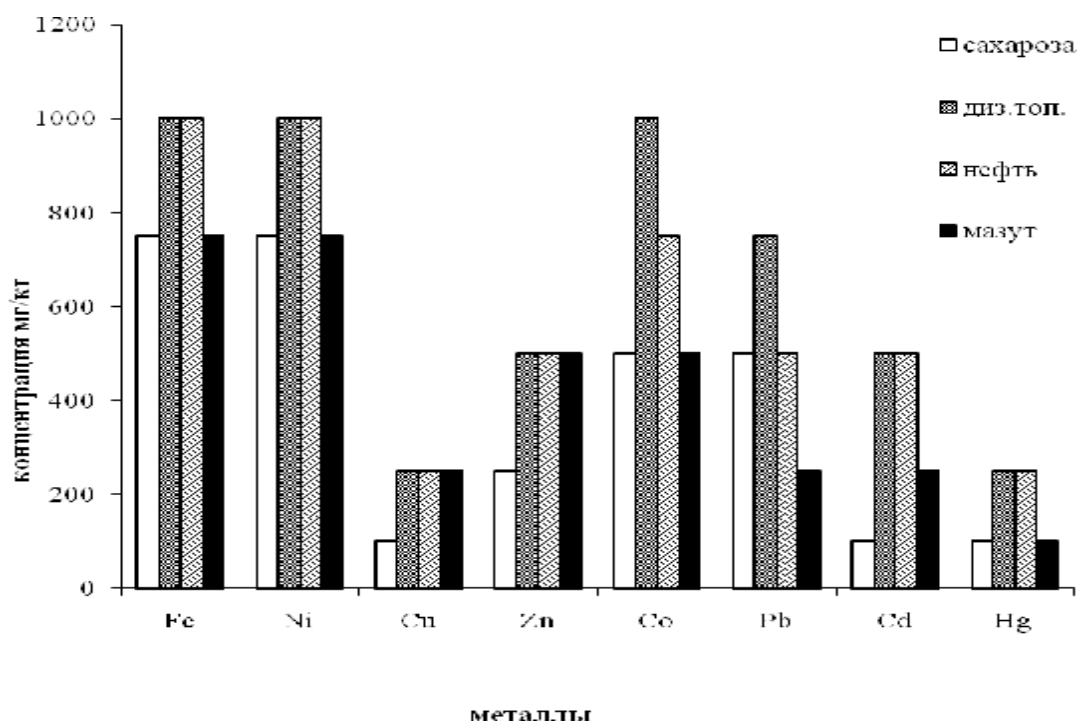


Рис.5. Изменение МИК металлов при культивировании штамма *Rhodococcus sp. 1167* на различных источниках углерода

Наиболее чувствительными оказались представители родов *Arthrobacter*, *Gordonia*, и *Micrococcus* (рис. 6-8).

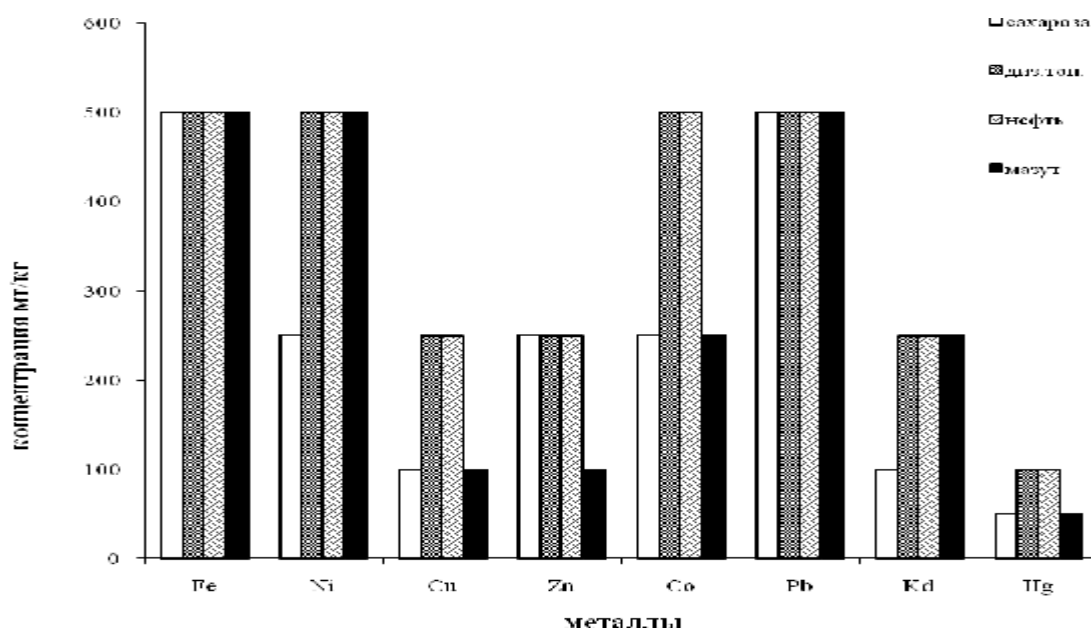


Рис.6. Изменение МИК металлов при культивировании штамма *Gordonia sp. K6* на различных источниках углерода

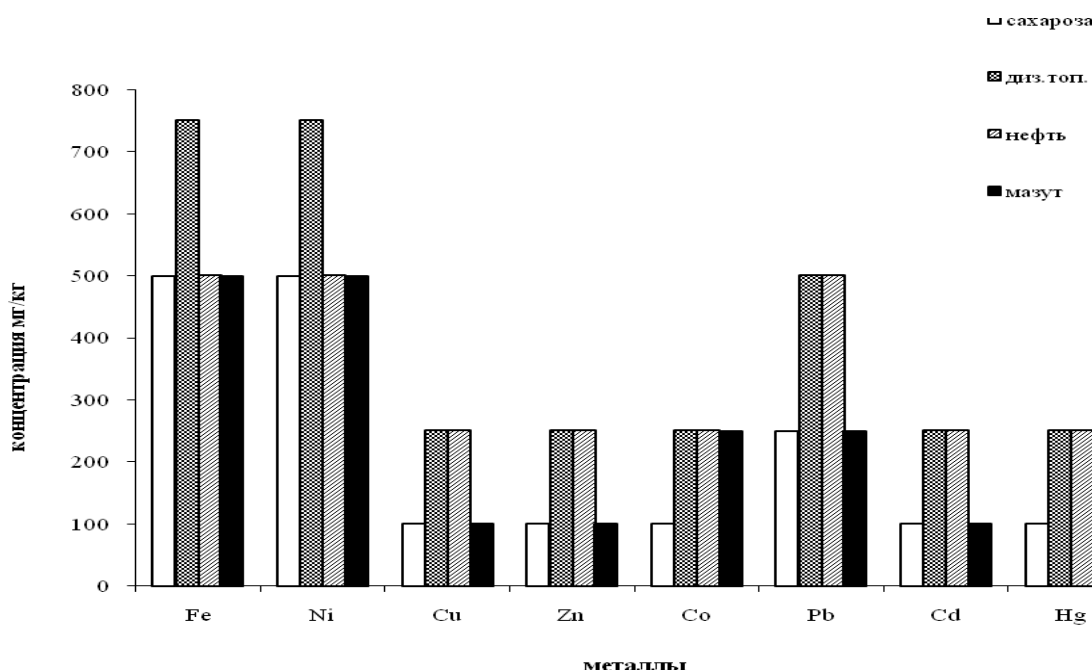


Рис.7. Изменение МИК металлов при культивировании штамма *Arthrobacter sp. N15* на различных источниках углерода

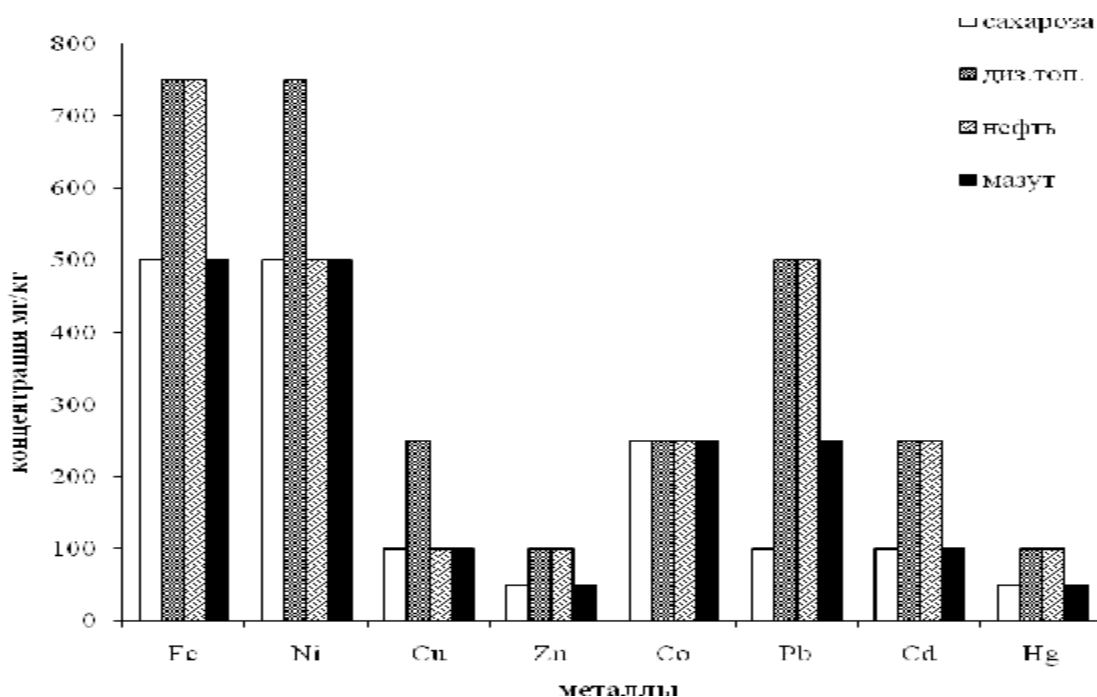


Рис.8. Изменение МИК металлов при культивировании штамма *Micrococcus sp. 25* на различных источниках углерода

Порог чувствительности последних был почти вдвое ниже, чем у родококков. Различные источники углерода существенно влияли на степень устойчивости к металлам. Так при использовании в качестве источника углерода легко метаболизируемых углеводов (дизельное топливо и, в некоторых случаях, сырая нефть) отмечалось увеличение устойчивости к повышенным концентрациям тяжёлых металлов по сравнению с опытом, где в качестве источника углерода использовалась сахароза (рис. 1-8). На средах с мазутом в качестве источника углерода уровень устойчивости к тяжелым металлам несколько снижался по сравнению с дизельным топливом, и приблизительно соответствовал таковому при использовании сред с сахарозой.

При изучении влияния тяжёлых металлов на деструктивную активность нефтеокисляющих штаммов актиномицетов культуры высевались на среды с углеводородами, дополнительно содержащие тяжелые металлы в

количестве 50% от МИК. В процессе инкубирования выяснилось, что наиболее сильно на процесс утилизации нефтепродуктов влияют Hg(II) и Cu(II), а наименее – Fe(III) и Ni(II), уровень влияния остальных металлов варьирует в зависимости от штамма (Таблица 1). Как следует из таблицы все металлы в зависимости от степени ингибирования процесса деградации углеводов можно расположить в следующей последовательности: Fe²⁺>Ni²⁺>(Cd³⁺, Zn²⁺, Pb²⁺, Co²⁺)>Cu²⁺>Hg²⁺.

Таблица 1. Степень деструкции углеводов штаммами актиномицетов в зависимости от присутствия тяжёлых металлов в среде

штамм	металлы				
	Fe(III)	Ni(II)	Cu(II)	Cd(III)	контроль
Rhodococcus erythropolis. F1	71%	67%	25%	48%	93%
Rhodococcus erythropolis B2	74%	69%	22%	49%	96%
Rhodococcus sp. J8	65%	65%	20%	45%	91%
Rhodococcus sp. 45	70%	71%	21%	40%	92%
Rhodococcus sp. 1167	67%	63%	22%	47%	94%
Arthrobacter sp. N15	60%	61%	10%	37%	89%
Gordonia sp. K6	65%	67%	16%	41%	88%
Micrococcus sp. 25	56%	58%	9%	28%	86%
	металлы				
	Zn(II)	Co(II)	Pb(II)	Hg(II)	контроль
Rhodococcus erythropolis. F1	39%	55%	43%	21%	93%
Rhodococcus erythropolis B2	43%	57%	45%	23%	96%
Rhodococcus sp. J8	35%	54%	39%	18%	91%
Rhodococcus sp. 45	32%	52%	32%	18%	92%
Rhodococcus sp. 1167	33%	56%	40%	19%	94%
Arthrobacter sp. N15	26%	42%	28%	9%	89%
Gordonia sp. K6	28%	53%	37%	13%	88%
Micrococcus sp. 25	21%	35%	22%	5%	86%

Наибольшую нефтеокисляющую активность в присутствии металлов сохраняют штаммы, относящиеся к роду *Rhodococcus*, затем следуют штаммы *Gordonia sp. K6* и *Arthrobacter sp. N15*, наименьшую активность проявляет штамм *Micrococcus sp. 25*.

Таким образом, проведённые нами опыты показали, что степень устойчивости исследуемых штаммов актиномицетов к тяжёлым металлам зависит от источника углерода и таксономической принадлежности мик-

роорганизмов. При использовании данных культур микроорганизмов как основы биопрепарата для углеводородзагрязнённых территорий с повышенным содержанием тяжёлых металлов следует учитывать не только количественный, но и качественный состав поллютанта.

Штаммы *Rhodococcus erythropolis* B2, *Rhodococcus erythropolis* F1, *Rhodococcus* sp J8 могут быть использованы в качестве основы при создании нефтеокисляющего биопрепарата, способного ликвидировать нефтяные загрязнения при наличии высоких концентраций тяжёлых металлов в среде.

Работа выполнялась в рамках проекта "Разработка научно-обоснованных подходов к культивированию биотехнологически перспективных микроорганизмов-нефтедеструкторов для создания регионально-адаптированных биопрепаратов".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Ключарёв Л.А. // Ингибиторы синтеза белка. Л. 1975.
2. Александров В.Я. // Клетки, макромолекулы и температура. Л.: Наука. 1975.
3. Фурьева А.В., Письман Т.И., Печуркин Н.С., Елпина Т.В. // Управление биосинтезом водородных бактерий и других автотрофов. Красноярск. 1976.
4. Hughes M.N, Pool R.K. // Metals and microorganisms. N.Y. 1986.
5. Семёнов А.М., Ховрычев М.П. Ингибирование роста *Candida utilis* некоторыми тяжёлыми металлами // Микробиология. 1979. Т.48. №6 С.1120.
6. Анисимова Л.А., Сиунова Т.В., Боронин А.М. Устойчивость к металлам грамотрицательных бактерий, изолированных из почв и сточных вод промышленных районов // Микробиология. 1993. Т.62. №5 С.843.
7. Knight B.P., McGrath S.P., Chaudri A.M. Biomass carbon measurements and substrate utilization patterns of microbial population from soils amended with cadmium, copper, or zinc. Applied and Environmental Microbiology. 1997. V.63. P.39-43
8. Kabata-Pendias A. Behavioural properties of trace metals in soils. Applied Geochemistry 1993. №2. P.3-9
9. Scott-Fordsmund J.J. Toxicity of nickel to soil organisms in Denmark. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. 1997. V.148. P.1-34
10. Giller K.E., Witter E., McGrath S.P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils. Soil Biology & Biochemistry. 1998. V.30. P.1389-1414
11. Определитель бактерий Берджи 9 изд. / Москва. 1997. 799с.
12. Герхардт Ф. // Методы общей бактериологии. Москва 1983. Т1. 536с.