

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 579.66

В.Н. ФЕДОРЕНКО*, М.К. КНЯЗЮК, А.И. НЕТРУСОВ, А.И. ШЕСТАКОВ

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991

e-mail: vndorenko@gmail.com

Активность штаммов *Cobetia marina* S2 и *Nocardia coeliaca* S1 в отношении углеводов нефти и прогнозирование их выживаемости после лиофилизации

Проведено исследование морских психроактивных микроорганизмов, способных к деструкции углеводов при 4°. Оценивали биоэмульгирующую активность и убыль углеводов нефти при использовании культур *Cobetia marina* S2 и *Nocardia coeliaca* S1. На основании полученных результатов представляется возможным определить данные штаммы как перспективные компоненты биопрепарата для утилизации нефтяных загрязнений в арктическом регионе. Исследуемые культуры сохраняли методом лиофильного высушивания, после чего оценивали устойчивость штаммов к условиям лиофилизации и влияние состава защитной среды на жизнеспособность и активность микробных клеток при различных условиях хранения. Установлено, что сахароза в сочетании с сухим обезжиренным молоком является более эффективной защитной средой для лиофилизации культур *C. marina* S2 и *N. coeliaca* S1 по сравнению с тремя другими исследованными протекторами. Показано, что время хранения штаммов сильно зависит от их видовой принадлежности. С использованием среды «сахароза + СОМ» прогнозируемый срок хранения при 4° для *C. marina* S2 составляет около 5 мес, в то время как для штамма *N. coeliaca* S1 — не менее 100 лет. Был также изучен вклад эмульгирования в убыль углеводов нефти и предложена гипотеза, определяющая роль данного процесса в ходе микробной утилизации нефтяных загрязнений.

Ключевые слова: биоремедиация, биосурфактанты, биоэмульгирование, деструкция углеводов, лиофилизация, углеводородокисляющая активность, ускоренное хранение.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-4-9-20

Разработка микробных биопрепаратов для утилизации нефтяных загрязнений является одним из перспективных направлений биотехнологии. Предполагаемое расширение индустрии нефтедобычи в арктическом регионе увеличивает интерес к данной теме, а также требует разработки новых препаратов, которые бы функционировали в условиях низких температур. Утилизация нефтепродуктов микроорганизмами — многостадий-

ный процесс, важными этапами которого являются продукция микроорганизмами биосурфактантов и биодеградация углеводов до более простых соединений [1]. Процесс создания биопрепарата включает не только поиск и исследование микроорганизмов, активных в отношении нефти, но и множество других задач, одной из которых является разработка подходящих методов хранения эффективных штаммов.

Федоренко Виктория Николаевна, Князюк Маргарита Константиновна, Нетрусов Александр Иванович, Шестаков Андрей Иннокентьевич.

Список сокращений: БС — бесклеточный супернатант; КЖ — культуральная жидкость; КОЕ — колониеобразующая единица; НД — смесь нефти и дизельного топлива; ПАВ — поверхностно-активное вещество; ПЦР — полимеразная цепная реакция; СОМ — сухое обезжиренное молоко.

* Автор для переписки.

В рамках изучения процессов утилизации нефти наибольшее внимание уделяется биодеградации ее компонентов [1, 2]; однако не менее важным аспектом деятельности микроорганизмов является продукция биосурфактантов. Синтез поверхностно-активных веществ приводит к солубилизации нефти, что повышает ее доступность как источника питательных веществ для клеток микроорганизмов и облегчает биодеградацию [3, 4]. Кроме того, при эмульгировании нефтепродуктов происходит увеличение удельной площади взаимодействия поверхности углеводородных капель с жидкой и газовой фазами, что способствует интенсификации процесса испарения углеводородов с водной поверхности [5]. Следовательно, в качестве основы для биопрепаратов должны быть использованы штаммы микроорганизмов, как способные к ферментативному окислению углеводородов, так и продуцирующие биосурфактанты различных типов.

Разработка технологии производства биопрепаратов, способных длительно сохранять жизнеспособность и функциональную активность клеток микроорганизмов различных систематических групп, является актуальной задачей современной биотехнологии [6, 7]. Лиофильное (сублимационное) высушивание зарекомендовало себя как надежный метод длительного хранения микробной биомассы, а сухие формы препаратов — как наиболее удобные формы для транспортировки на большие расстояния. Вместе с тем, эффективность лиофилизации зависит от множества факторов: биологических особенностей микроорганизмов, связанных с их видовой специфичностью, возраста культуры, состава защитных сред, режима сублимации, условий хранения и т.д.

Цель настоящего исследования состояла в выявлении особенностей поверхностно-активных веществ, продуцируемых бактериями *C. marina* S2 и *N. coeliaca* S1, оценке вклада процесса биоэмульгирования в убыль углеводородов нефти, исследовании жизнеспособности штаммов после лиофилизации и в процессе хранения и их биологической активности после восстановления из высушенного состояния.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектами исследования являлись чистые культуры микроорганизмов *N. coeliaca* S1 и *C. marina* S2, выделенные из микробного сообщества Csha2, полученного из пробы нефтезагрязненной смеси водорослей портовой зоны г. Кандалакша.

Питательные среды и условия культивирования микроорганизмов. Выращивание микроорганизмов проводили на питательных средах следующего состава, г/л:

- модифицированная среда Plate Count Agar (PCA): K_2HPO_4 — 1,5 («Химмед»); KH_2PO_4 — 0,75 («Химмед»); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 1,0 (AppliChem); $(NH_4)_2SO_4$ — 4,0 (AppliChem); NaCl — 30 (Panreac); гидролизат казеина — 5,0 (Himedia); дрожжевой экстракт — 2,5 (Helicon); D(+)-глюкоза — 1,0; дистиллированная вода, pH 7,0;

- модифицированная среда Таусона [8]: K_2HPO_4 — 1,5; KH_2PO_4 — 0,75; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 1,0; $(NH_4)_2SO_4$ — 4,0; NaCl — 30,0; гидролизат казеина (Himedia) — 0,5; дрожжевой экстракт (Helicon) — 0,1; дистиллированная вода, pH 7,0. Среды стерилизовали паром при 0,5 ати в течение 30 мин. Для получения плотных сред использовали пластинчатый агар («ФГУП ГНЦ ПМИБ», Оболенск) в количестве 20 г/л.

В качестве гидрофобных субстратов в различных экспериментах использовали следующие компоненты: гексадекан («ч.»; производство «Реахим»); смесь товарной нефти Возейского месторождения (плотность 37,9°API, сернистость 0,66 %, характеризуется как тяжелая, вязкая, с высоким содержанием смол и асфальтенов) и дизельного топлива в соотношении 1:1 по объему (смесь НД). Углеводороды стерилизовали в герметичных стеклянных флаконах паром в течение 30 мин при 1 ати и отдельно вносили в среду после стерилизации в количестве 1 % по объему.

Для оценки убыли углеводородов чистые культуры выращивали в 100 мл модифицированной среды Таусона с добавлением смеси НД. Культивирование микроорганизмов проводили в круглых плоскодонных колбах емкостью 250 мл в орбитальной качалке (130 об/мин) с системой контроля температур Innova 43/43R (New Brunswick Scientific) при 4° в течение 7 сут.

Исследование биоэмульгирующей активности штаммов проводили на обоих типах сред; в некоторых вариантах эксперимента в опытные колбы дополнительно вносили гексадекан в количестве 1% по объему. Культивирование осуществляли в 100 мл питательной среды в орбитальной качалке (New Brunswick Excella E24/24R Incubator shaker) (130 об/мин) при 25°. Время культивирования для штамма *N. coeliaca* S1 составляло 3 сут, для *C. marina* S2 — 24 ч. Температурный режим был подобран исходя из того, что данные культуры проявляют способность к биоэмульгированию как при 4°, так и при 25° (визуальная оценка в предварительном эксперименте при культивирова-

нии с нефтью), но при этом во втором случае требуется значительно меньше времени для роста культуры. По окончании культивирования в зависимости от задач эксперимента использовали культуральную жидкость (КЖ) или бесклеточный супернатант (БС). Для удаления гексадекана из проб колбы помещали в холодильник (4°) на 5—7 мин, после чего стеклянной пипеткой отбирали КЖ из-под затвердевшей гексадекановой фазы ($t_{пл}=18^\circ$). Для получения БС 40 мл КЖ вносили в центрифужные пробирки типа Falcon (V=50 мл) и центрифугировали при 10° и 12000 об/мин в течение 10 мин на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5810R. После этого супернатант пропускали через салфетку из нетканого материала для удаления следов гексадекана. Отфильтрованный БС использовали для проведения экспериментов.

Выделение чистых культур микроорганизмов, способных к деструкции нефти, проводили при 4° методом наложения стерильного целлюлозного фильтра (ОАО «Завод «Химреактивкомплект»», Россия), пропитанного 500—600 мкл НД, на поверхность плотной модифицированной среды РСА с биомассой микроорганизмов.

Идентификация чистых культур микроорганизмов была проведена методом секвенирования нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. ДНК из биомассы бактерий выделяли согласно методу [9]. Для проведения полимеразной цепной реакции и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК была использована универсальная праймерная система [10]. Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов генов, кодирующих 16S рРНК и гиразы В, осуществляли по методу Сэнгера с соавт. [11]. Для секвенирования использовали праймеры [10]. Чтение последовательностей нуклеотидов проводили в двух направлениях.

Степень деструкции нефти микроорганизмами оценивали гравиметрическим методом по суммарному показателю убыли нефти в жидкой среде [12] и выражали в процентах от контроля. Контролем при определении степени испарения легких углеводородных фракций служила питательная среда с добавлением 1 мл НД (1:1), находившаяся в отдельной колбе в одной качалке с опытными образцами.

Измерение показателя поверхностного натяжения проводили методом уравнивания пластины (метод Вильгельми) [13]. Измерения проводили в супернатанте исследуемой культуры при 20° на тензиометре, представляющим собой торсионные весы ВТ-500 с подвешенной алюминиевой пластиной.

Поверхностное натяжение рассчитывали по формуле:

$$\sigma = mg/2l, \quad (1)$$

где m — масса отрыва пластины (среднее из трех измерений), г; $g = 9,8 \text{ м/с}^2$ — ускорение свободного падения; $l = 15,7 \text{ мм}$ — длина линии отрыва (ширина пластины). Снижение поверхностного натяжения ($\Delta\sigma$) рассчитывали как разницу между значениями поверхностного натяжения стерильной среды (контроль) и пробы исследуемой культуры.

Определение индекса эмульгирования проводили методом Купера и Гольденберга [14]. В мерные пробирки (V = 25 мл) с притертыми пробками вносили 5 мл гексадекана и 5 мл исследуемой жидкости, закрывали и перемешивали на вортексе (Vortex V-1 plus, Biosan) в течение 2 мин при максимальной скорости. Затем оставляли пробирки на 24 ч при комнатной температуре, после чего измеряли высоту столбца образовавшейся эмульсии ($H_э$) и высоту столбца всей жидкости ($H_{жс}$) в пробирке. Индекс эмульгирования (E_{24}) рассчитывали по формуле:

$$E_{24} = H_э/H_{жс} \cdot 100\%. \quad (2)$$

Для измерения использовали КЖ и БС исследуемых культур; контролем во всех случаях служили стерильные питательные среды.

Долговременное хранение чистых культур проводили методом лиофильного высушивания. В качестве защитной среды использовали 1) раствор сухого обезжиренного молока (СОМ) (10%) и глюкозы (7,5%); 2) раствор СОМ (10%) и сахарозы (7,5%); 3) раствор декстрана (Dextran T20, Mw 20000, Ferak Berlin, Германия) (10%) и глюкозы (7,5%); 4) раствор декстрана (10%) и сахарозы (7,5%). Среда стерилизовали паром при 0,5 ати в течение 30 мин. Суспензии микроорганизмов готовили по методу [15] и вносили их по 0,5 мл в стерильные ампулы с перетяжкой, изготовленные из нейтрального стекла. Соотношение защитная среда—биомасса составляло 1:10 по объему. Лиофилизацию проводили на установке для лиофильной сушки Labconco FreeZone 1 L при глубине вакуума 4,3 Па и температуре конденсатора -52° в течение 2 сут.

Для определения численности жизнеспособных клеток микроорганизмов применяли метод стандартных серийных разведений [16] с последующим посевом на плотную среду РСА. Выживаемость определяли по отношению числа сохранившихся клеток к контролю — исходному числу жизнеспособных клеток (до начала хранения).

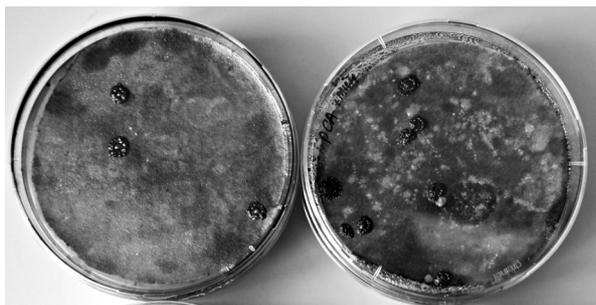


Рис. 1. Осветление пропитанных углеводородной смесью целлюлозных фильтров в местах роста колоний микроорганизмов

Fig. 1. Clarification of cellulose filters impregnated with hydrocarbon-containing mixture at sites where microbial colonies grow

Для определения возможного времени хранения при 4° использовали ускоренный тест прогнозирования выживаемости лиофилизированных культур бактерий (тест термостабильности) с использованием уравнения Аррениуса: $K = K_0 e^{-E/RT}$, где K_0 — предэкспоненциальный множитель, E — энергия активации, R — газовая постоянная, T — абсолютная температура ($273^\circ + t^\circ$) [17]. Для анализа экспериментальных данных использовали метод наименьших квадратов [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Углеводородокисляющая активность микроорганизмов

Известно [19], что способность микроорганизмов к эмульгированию нефти часто ассоциирована с углеводородокисляющей активностью, однако многие из этих организмов продуцируют биосурфактанты, но не способны расщеплять углеводороды. Для выделения чистых культур, активных в отношении нефти, была разработана новая методика, суть которой заключается в нанесении смеси углеводородов на целлюлозный фильтр с его последующей аппликацией на поверхность колоний микроорганизмов, выросших на плотной питательной среде. Показателем активности культур в отношении углеводородов нефти являлось появление на фильтрах зон осветления в местах роста колоний. При этом у ряда культур наблюдали дальнейший рост не только под фильтрами, но и на их поверхности (рис. 1). Сохранение ферментативной активности клеток после тесного контакта с углеводородной смесью свидетельствует об устойчивости бактерий к возможному токсическому воздействию углеводородов. Вполне вероятно, что этот эффект обусловлен не только активностью углеводородокисляющей ферментной системы, но и синтезом поверхностно-активных веществ (ПАВ), ускоряющих микробную биодegradацию (см. ниже).

В ходе работы из исследуемого сообщества психроактивных микроорганизмов *Csha2* данным методом выделили бактериальные штаммы, которые были идентифицированы как *Cobetia marina* S2 и *Nocardia coeliaca* S1.

В работе оценивали способность исследуемых штаммов к утилизации углеводородной смеси гравиметрическим методом. Было установлено, что процент убыли углеводородов при 4° в жидкой минеральной среде Таусона спустя 10 сут культивирования для *C. marina* S2 составил до 55%, для *N. coeliaca* S1 — до 20%. На основании результатов осветления целлюлозных фильтров, пропитанных углеводородами, было выдвинуто предположение о том, что полученные данные гравиметрического анализа можно объяснить не только биохимической составляющей убыли углеводородов (микробным окислением), но и биосурфактантной активностью микроорганизмов, а также вкладом физического фактора, обусловленного испарением нефтепродуктов в процессе биоэмульгирования.

Биоэмульгирующая активность микроорганизмов

Результаты измерения поверхностного натяжения и определения индекса эмульгирования для данных культур микроорганизмов представлены в табл. 1.

При анализе полученных экспериментальных данных были выдвинуты некоторые предположения о свойствах и типе биосурфактантов исследуемых культур микроорганизмов, а также об их влиянии на убыль углеводородов при культивировании на среде с добавлением смеси нефти и дизельного топлива, изложенные ниже.

Для культуры *N. coeliaca* S1 высокие значения индекса эмульгирования (E_{24}) и снижения поверхностного натяжения ($\Delta\sigma$) были обнаружены только при росте на среде с гексадеканом. В соответствии с литературными данными [20], грампо-

Таблица 1
Table 1

Результаты определения индекса эмульгирования и поверхностного натяжения ($\Delta\sigma$) КЖ и БС *C. marina* S2 и *N. coeliaca* S1 при культивировании в присутствии гексадекана

Index of emulsification and surface tension ($\Delta\sigma$) in culture media and cell-free extract of *C. marina* S2 and *N. coeliaca* S1 grown in the occurrence of hexadecane

Микроорганизм Bacteria	<i>C. marina</i> S2				<i>N. coeliaca</i> S1			
	Бедная среда Poor medium		Богатая среда Rich medium		Бедная среда Poor medium		Богатая среда Rich medium	
Свойства среды Medium characteristics	без гекса- декана without hexadecane	в присутствии гексадекана with hexadecane	без гекса- декана without hexadecane	в присутствии гексадекана with hexadecane	без гекса- декана without hexadecane	в присутствии гексадекана with hexadecane	без гекса- декана without hexadecane	в присутствии гексадекана with hexadecane
	Индекс эмульгирования (E_{24}), % Index of emulsification, (E_{24}), %	17	0	30	26	0	0	6
КЖ Culture liquid	15	0	22	31	5	52	7	57
$\Delta\sigma$ для БС, мН/м $\Delta\sigma$ for cell-free supernatant, mN/m	15,0	8,4	5,0	1,9	2,3	12,0	0,6	2,5

Примечание: бедная среда — модифицированная среда Таусона; богатая среда — модифицированная среда PCA.
Footnote: Poor medium is a modified Towson medium; rich medium is a modified PCA medium.

ложительные микроорганизмы, проявляющие биоэмульгирующую активность, образуют гидрофобный слой на поверхности клеток, что обеспечивает транспорт гидрофобных субстратов внутрь клетки. Данное предположение подтверждается визуальными наблюдениями: биомасса в колбах, в которые был добавлен гексадекан, находилась вблизи гидрофобной фазы, тогда как в колбах без гексадекана клетки были равномерно распределены в объеме среды. Кроме того, для данной культуры эмульгирующая активность наблюдалась только в КЖ, что позволяет предположить, что исследуемый микроорганизм является продуцентом биосурфактантов, связанных с поверхностью клетки и обеспечивающих адсорбцию клеток на гексадекане. Анализируя убыль углеводов и биоэмульгирующую активность культуры, можно также предположить, что в данном случае биодеградация нефти (20%) связана с изменением клеточной поверхности, способствующим разрушению углеводов нефти за счет облегчения транспорта гидрофобных субстратов внутрь клетки.

Для культуры *C. marina* S2 наибольшие значения индекса эмульгирования (E_{24}) наблюдались при росте на богатой среде (модифицированная РСА), тогда как снижение поверхностного натяжения было максимальным при росте на обедненной среде (модифицированная среда Таусона). Исходя из этих данных, можно предположить, что в зависимости от количества доступных питательных веществ, а также гидрофильности/гидрофобности субстрата *C. marina* S2 продуцирует поверхностно-активные вещества различной природы. Известно, что низкомолекулярные биоПАВ эффективнее снижают поверхностное натяжение, в то время как высокомолекулярные способствуют стабилизации эмульсий [21, 22]. Отсюда можно заключить, что, вероятно, при росте на богатой среде исследуемый микроорганизм продуцирует высокомолекулярные биосурфактанты, а при росте на обедненной среде — низкомолекулярные. При этом значения индекса эмульгирования и снижения поверхностного натяжения были приблизительно одинаковы для КЖ и супернатанта, что говорит о продукции внеклеточных биосурфактантов. В данном случае биоэмульгирующая активность также влияет на убыль углеводов нефти, причем предполагаемый механизм действия внеклеточных биосурфактантов подразумевает создание микроэмульсий нефти вблизи клеток. Таким образом, солубилизованные капли нефти, окруженные поверхностно-активными веществами, оказываются в толще среды и легко доступны для био-

деградации. Кроме того, образовавшиеся микроэмульсии обеспечивают увеличение удельной площади взаимодействия поверхности углеводородных капель с жидкой и газовой фазами, что может способствовать интенсификации процесса испарения углеводородов с водной поверхности. Анализ результатов оценки биосурфактантной активности и гравиметрии для культуры *C. marina* S2 позволяет предположить, что высокая степень биодеградации углеводородов данной культурой (55%) связана с продукцией биосурфактантов. Внеклеточные биосурфактанты, синтезируемые *C. marina* S2, по-видимому, обеспечивают солубилизацию гидрофобного субстрата, способствуя биодеградации и интенсификации испарения углеводородов.

Таким образом, с определенной долей вероятности была установлена способность данных штаммов микроорганизмов к продукции биосурфактантов, однако механизм действия их биоПАВ, синтезируемых разными штаммами, различен. Если культура *N. coeliaca* S1 модифицирует поверхность клеток, обеспечивая их адсорбцию к углеводородной фазе, то культура *C. marina* S2 является продуцентом внеклеточных биосурфактантов, которые не только способствуют биодеградации, но и интенсифицируют процессы испарения углеводородов нефти.

Полученные результаты позволяют заключить, что исследуемые микроорганизмы обладают активностью (углеводородокисляющей, биоэмульгирующей) в отношении углеводов нефти, что говорит о возможности их применения при создании биопрепаратов для очистки нефтяных загрязнений. Важно отметить, что процесс убыли нефти происходил в достаточно жестких условиях (4°, 30 г/л NaCl), которые являются неблагоприятными для жизни многих бактерий. Тем не менее, исследуемые штаммы показали высокий уровень биодеградации углеводов, сравнимый с соответствующими значениями для углеводородокисляющих микроорганизмов в условиях нормальной солености и температуры [23—25].

Выживаемость штаммов при хранении

Одним из факторов, оказывающих влияние на длительность хранения биоматериала, является выбор защитной среды. В работе проводили сравнительную оценку выживаемости клеток в зависимости от состава четырех типов протекторов: глюкоза + СОМ, сахароза + СОМ, глюкоза + декстран и сахароза + декстран.

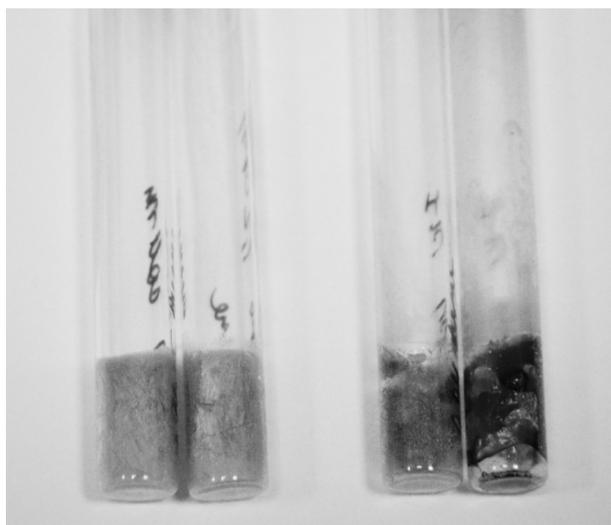


Рис. 2. «Неферментативное потемнение» биомассы клеток в среде с протекторами, содержащими глюкозу (две ампулы справа)

Fig. 2. Non-enzymatic darkening of cell biomass in protective glucose-containing medium (two vials right)

Для успешной лиофилизации плотность микроорганизмов в защитной среде должна быть как можно более высокой, 10^9 — 10^{10} кл/мл [16]. Исходная плотность клеток для выделенных культур в суспензиях для консервации составляла не менее 10^{10} КОЕ/мл. Показано, что численность жизнеспособных клеток изучаемых микроорганизмов сразу после лиофилизации в значительной степени зависела от состава защитной среды. Наибольшее число клеток штаммов *N. coeliaca* S1 сохранялось при использовании протектора «сахароза + СОМ» и «сахароза + декстран», для штамма *C. marina* S2 — при использовании защитной среды «глюкоза + СОМ». При этом применение всех указанных выше защитных сред вызывало уменьшение титра клеток *C. marina* S2 после лиофилизации примерно в 4—11 раз относительно исходной точки (в зависимости от вида защитной среды), а титра *N. coeliaca* S1 — в 2—3 раза.

С целью получения экспресс-оценки длительности хранения исследуемых культур применяли метод «ускоренного хранения», включающий исследование жизнеспособности лиофилизованных культур с использованием уравнения Аррениуса при повышенных температурах и экстраполяцию полученных результатов на реальные условия хранения (4°). Основной принцип метода заключается в том, что при повышенной температуре существенно возрастает подвижность молекул воды и других веществ, вследствие чего возрастает и скорость химических реакций, лимитирующих срок хранения [26], в связи с чем изменения свойств препарата, присущие окончанию срока хранения, происходят значительно быстрее. Для прогнозирования срока хранения исследуемых культур микроорганизмов ампулы с лиофилизованными

клетками хранили при 35° или 50° , после чего оценивали жизнеспособность бактерий.

Было установлено, что высокая температура хранения оказывает отрицательное воздействие на выживаемость исследуемых культур; в частности, при использовании защитных сред «глюкоза + СОМ» и «глюкоза + декстран» показатели выживаемости клеток снижались до нулевых значений спустя 10 сут хранения при 50° и 35° , в связи с чем прогнозирование выживаемости оказалось невозможным. При этом наблюдали изменение структуры матрикса лиофилизованных культур, его плотности, пористости, цвета со светло-желтого на коричневый, что свидетельствовало о протекании в препаратах реакции Майяра — сложной последовательности химических превращений, происходящих при нагревании между редуцирующими сахарами и свободными аминокислотами и пептидами [27]. Глюкоза в отличие от сахарозы является редуцирующим сахаром, вследствие чего обладает довольно высокой реакционной способностью и быстро вовлекается в реакции «неферментативного потемнения» при повышении температуры хранения (рис. 2).

Предполагается, что отсутствие роста микробных клеток после их хранения при 35° или 50° может быть обусловлено возможным ингибирующим действием продуктов реакции Майяра, что подтверждается литературными данными [28, 29].

На основании ускоренного теста термостабильности был сделан прогноз времени хранения лиофилизованных культур при 4° (табл. 2). Для этого по уравнению Аррениуса были рассчитаны значения констант K , характеризующих скорость физико-химических процессов, протекающих в лиофилизованных препаратах при данной темпе-

Таблица 2
Table 2

Прогнозируемые и экспериментально полученные показатели выживаемости лиофилизированных клеток углеводородокисляющих микроорганизмов при хранении (4°)
Predicted and experimentally obtained data on survival of lyophilized cells of hydrocarbon-oxidizing microorganisms during storage at 4°C

Штамм Strain	Защитная среда Protector	Константа скорости, K Rate constant, K	Титр после лиофилизации, КОЕ/мл Titer after lyophilization, CFU/ml	Прогнозируемая выживаемость, КОЕ/мл, после хранения в течение различных сроков, мес Predicted survival, CFU/ml, after storage for various periods, month													
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
<i>C. marina</i> S2	Сахароза+ COM	0,13415	7,90·10 ⁹	1,41·10 ⁸	2,52·10 ⁶	4,51·10 ⁴	8,06·10 ²	1,44·10 ¹	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Sucrose + dry skimmed milk																
<i>N. coeliaca</i> S1	Сахароза + декстран	0,19070	6,50·10 ⁹	2,13·10 ⁷	6,98·10 ⁴	2,29·10 ²	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Sucrose + dextran																
<i>N. coeliaca</i> S1	Сахароза+ COM	0,00046	1,20·10 ¹⁰	1,18·10 ¹⁰	1,17·10 ¹⁰	1,15·10 ¹⁰	1,14·10 ¹⁰	1,12·10 ¹⁰	1,10·10 ¹⁰	1,09·10 ¹⁰	1,07·10 ¹⁰	1,06·10 ¹⁰	1,04·10 ¹⁰	1,03·10 ¹⁰	1,02·10 ¹⁰		
	Sucrose + dry skimmed milk																
<i>N. coeliaca</i> S1	Сахароза +декстран	0,00103	1,21·10 ¹⁰	1,17·10 ¹⁰	1,14·10 ¹⁰	1,10·10 ¹⁰	1,07·10 ¹⁰	1,04·10 ¹⁰	1,00·10 ¹⁰	9,74·10 ⁹	9,44·10 ⁹	9,15·10 ⁹	8,87·10 ⁹	8,60·10 ⁹	8,34·10 ⁹		
	Sucrose + dextran																

«←» — выживаемость клеток равна нулю.
(—), survival is equal to zero.

ратуре и приводящих к снижению выживаемости клеток. При изучении влияния сахарозосодержащих защитных сред на выживаемость микроорганизмов было установлено, что высокие значения титра клеток микроорганизмов, определяемые непосредственно после лиофилизации, не всегда коррелируют с длительностью сроков сохранения жизнеспособности культур.

Проведенные исследования показали, что культуры выдерживают процесс лиофилизации с разной степенью успешности. Несмотря на то, что комбинации «сахароза + СОМ» и «сахароза + декстран» обеспечивают хорошую выживаемость культуры *C. marina* S2 после лиофилизации, при длительном хранении (4°) в ней ожидается сильное и быстрое падение титра жизнеспособных клеток по сравнению с исходным значением, особенно в случае среды «сахароза + декстран». Согласно прогнозу, время хранения штамма *C. marina* S2 с использованием среды «сахароза + СОМ» составит около 3—4 мес. Полученный результат свидетельствует о необходимости дальнейших исследований по подбору защитных сред, способов и режимов консервации для данного штамма углеводородокисляющих микроорганизмов с целью увеличения срока их хранения.

Вместе с тем, штаммом *N. coeliaca* S1 были продемонстрированы высокие показатели выживаемости. Прогнозируемый срок хранения данной культуры при 4° с использованием защитных сред «сахароза + декстран» и «сахароза + СОМ» составляет не менее 100 лет. Столь высокие показатели можно объяснить повышенным содержанием ненасыщенных жирных кислот в клеточных стенках данной культуры, что, вероятно, обеспечивает устойчивость клеток к замораживанию—высушиванию. Известно, например, что грамположительные бактерии, к которым относится *N. coeliaca*, лучше переносят воздействие различных повреждающих факторов, чем грамотрицательные, как *C. marina* [30], что подтверждается и результатами проведенного эксперимента.

Для оценки способности изучаемых штаммов к разрушению углеводородов после лиофилизации биомассу, лиофилизованную в присутствии протектора «сахароза + СОМ», инокулировали в жидкую среду Таусона с углеводородами. Проверку достоверности полученных результатов проводили путем двух дополнительных последовательных пересевов исследуемых образцов. Показано, что изучаемые штаммы сохраняли способность к деструкции углеводородов при 4° после лиофильного высушивания на протяжении всех трех пассажей культивирования. В частности, активность

C. marina S2 в отношении углеводородов, сохранявшаяся в течение ряда последовательных пересевов, проявлялась в образовании мицелл нефти у поверхности раздела фаз, разбивании пленки нефти и помутнении среды, свидетельствующем о наращивании биомассы клеток. Культура *N. coeliaca* S1 кроме выше перечисленных показателей характеризовалась еще и изменением цвета среды со светло-желтого (в случае первого и второго пересевов) и бесцветного (в случае третьего посева) до темно-коричневого, что, вероятно, связано с активным эмульгированием, деструкцией нефтяной пленки и переходом углеводородов в толщу среды.

Таким образом, на основании результатов проведенных исследований культур психроактивных микроорганизмов *C. marina* S2 и *N. coeliaca* S1 высказано обоснованное предположение, что каждый из исследованных штаммов является продуцентом биоэмульгирующих соединений, однако поверхностно-активные вещества, синтезируемые данными микроорганизмами, имеют различную природу. Так, штамм *C. marina* S2, демонстрировавший убыль нефти до 55%, скорее всего, продуцирует внеклеточные биосурфактанты, которые способствуют биодеградации нефти не только посредством ее солубилизации, но и путем интенсификации испарения углеводородов. Для культуры *N. coeliaca* S1 показана убыль нефти в количестве до 20%. Поскольку биосурфактанты данного штамма связаны с поверхностью клетки, то, вероятно, они обеспечивают проникновение гидрофобного субстрата в клетку, не влияя при этом на убыль углеводородов посредством биоэмульгирования. Таким образом, оба штамма проявляют активность в отношении нефти и могут быть использованы в качестве компонентов биопрепарата для ее разрушения.

На основе метода «ускоренного хранения» с использованием уравнения Аррениуса была показана возможность прогнозирования выживаемости активных в отношении углеводородов морских бактериальных культур. При хранении штамма *C. marina* S2 с использованием протекторов «сахароза + СОМ» и «сахароза + декстран» можно ожидать быстрого снижения численности жизнеспособных клеток этой культуры. Вместе с тем, несмотря на действие различных повреждающих факторов в процессе консервации, изучаемый микроорганизм сохраняет после лиофильного высушивания определенную активность в отношении углеводородов (углеводородокисляющую, биоэмульгирующую) в условиях низких температур. Полученный результат свидетельствует о необходимости поис-

ка других действенных защитных сред для длительного хранения бактерий *Cobetia marina*.

В отношении культуры *N. coeliaca* S1 наиболее сильное защитное действие оказывала среда «сахароза + СОМ»; хранение лиофилизованной с этой средой культуры при температуре 4° характеризуется значительно более высокой прогнозируемой выживаемостью клеток, чем образцов *C. marina* S2. Возможно, в клетках грамположительной бактерии *N. coeliaca* скорость окислительных процессов значительно ниже, чем в клетках грамотрицательных микроорганизмов, подобных *C. marina*, в связи с чем наблюдается более медленное падение титра клеток с течением времени. Таким образом, исследованные условия лиофилизации и длительного хранения являются эффективными для культуры *N. coeliaca* S1; они позволяют сохранить большое число жизнеспособных клеток с высокой функциональной активностью и могут быть использованы при получении сухой формы биопрепарата для утилизации нефтяных загрязнений в северных регионах.

Работы по данной статье поддержаны грантом РФФИ № 14-50-00029.

The work was supported by the Russian Research Fund, Project N 14-50-00029.

Получено 25.04.16

ЛИТЕРАТУРА

1. Fritsche, W., Hofrichter, M. Aerobic degradation by microorganisms: Biotechnology: Environmental Processes II. V. 11b. — 2nd ed. [Eds. H.-J. Rehm, G. Reed]. — Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH, 2000. — P. 146—164.
2. Heitkamp, M.A. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a *Mycobacterium* sp. in microcosms containing sediment and water from a pristine ecosystem / M.A. Heitkamp, C.E. Cerniglia // Appl. Environ. Microbiol. — 1989. — V. 55. — N 8. — P. 1968—1973.
3. Olivera, N. Microbial characterization and hydrocarbon biodegradation potential of natural bilge waste microflora / N. Olivera, M. Commendatore, O. Delgado, J. Esteves // J. Indust. Microbiol. Biotechnol. — 2003. — V. 30. — N 9. — P. 542—548.
4. Guha, S. Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants / S. Guha, P. Jaffe // Environ. Sci. Technol. — 1996. — V. 30. — N 2. — P. 605—611.
5. Barkay, T. Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan / T. Barkay, S. Navon-Venezia, E. Ron, E. Rosenberg // Appl. Environ. Microbiol. — 1999. — V. 65. — N 6. — P. 2697—2702.
6. Rogozina E.A. Сравнительная характеристика отечественных биопрепаратов, предлагаемых для очистки почв и грунтов от загрязнения нефтью и нефтепродуктами // Нефтегазовая геология. Теория и практика. — 2011. — Т. 5. — № 3 (www.ngtp.ru/rub/7/37.2010.pdf).
Rogozina, E.A. Comparative characteristics of here-made preparations for soil and ground remediation from pollution with oil and petroleum products // Neftegazovaya Geologiya. Teoriya i Praktika (Oil-and-Gas Geology. Theory and Practice). — 2011. — Т. 5. — N 3 (www.ngtp.ru/rub/7/37.2010.pdf).
7. Петриков К.В. Получение сухой формы биопрепарата для очистки от нефтяных загрязнений и изучение его свойств при долговременном хранении / К.В. Петриков, Е.П. Власова, А.А. Ветрова // Изв. Тульского гос. университета. Естественные науки. — 2010. — № 1. — С. 186—195.
Petrikov, K.V. Obtaining of dry biopreparations for decontamination of oil pollutions and study on its properties during long-term storage / K.V. Petrikov, E.P. Vlasova, and A.A. Vetrova // Izvestiya Tul'skogo Gosuniversiteta. Estestvennye Nauki (J. Tula State University. Sciences). — 2010. — N 1. — С. 186—195.
8. Таусон В.О. Основные положения растительной биоэнергетики. — М.: Изд-во АН, 1950. — 443 с.
Towson, V.O. Principles in Plant Bioenergetics. — Moscow: Izd-vo AN (Translated into Russian), 1950. — 443 p.
9. Булыгина Е.С. Изучение нуклеотидных последовательностей *nifH* генов у представителей метанотрофных бактерий / Е.С. Булыгина, Б.Б. Кузнецов, А.И. Марусина, И.К. Кравченко, С.А. Быкова, Т.В. Колганова, В.Ф. Гальченко // Микробиология. — 2002. — Т. 71. — № 4. — С. 500—508.
Bulygina, E.S. Investigation of nucleotide sequences *nifH* in genes of methanotrophic bacteria representatives / E.S. Bulygina, B.B. Kuznetsov, A.I. Marusina, I.K. Kravchenko, S.A. Bykova, T.V. Kolganova, and V.F. Gal'chenko // Mikrobiologiya (Microbiology). — 2002. — V. 71. — N 4. — С. 500—508.
10. Lane, D. J. 16S/23S sequencing: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. [Eds. E. Stackebrandt, A. Goodfellow, M. Chichester]. — Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 1991. — P. 115—175.
11. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1977. — V. 84. — P. 5463—5467.
12. Леоненко И.И. Методы определения нефтепродуктов в водах и других объектах окружающей среды / И.И. Леоненко, В.П. Антонович, А.М. Андрианов // Методы и объекты химического анализа. — 2010. — Т. 5. — № 2. — С. 58—72.
Leonenko, I.I. Methods in petroleum products detection in water and other environmental objects / I.I. Leonenko, V.P. Antonovich, and A.M. Andrianov // Metody i Ob'ekty Khimicheskogo Analiza (Methods and Subjects for Chemical Analysis). — 2010. — V. 5. — N 2. — P. 58—72.

13. Шукин Е.Д., Перцов А.В., Амелина Е.А. Коллоидная химия. — М.: Высшая школа, 2004. — 445 с.
Shchukin, E.D., Pertsov, A.V., and Amelina, E.A. Colloidal chemistry. — Moscow: Vysshaya Shkola, 2004. — 445 p.
14. Cooper, D.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species / D.G. Cooper, G.G. Goldenberg // Appl. Environ. Microbiol. — 1987. — V. 53. — N 2. — P. 224—229.
15. Stacey, G.N., Day, J.G. Long-term ex situ conservation of biological resources and the role of biological resource centers: Cryopreservation and freeze-drying protocols. - 2nd ed. [Eds. G.N. Stacey, J.G. Day]. — Totowa, NJ: Humana Press, 2007. — P. 1—14.
16. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений. [Под ред. А.И. Нетрусова]. — М.: Издательский центр «Академия», 2005. — 608 с.
Netrusov, A.I., Egorova, M.A., and Zakharchuk, L.M. Manual on microbiology: Train Aid for High School Students [Ed. A.I. Netrusov]. — Moscow: Izdatelskii Tsentr Akademia, 2005. — 608 p.
17. Кузнецов В.Д. Прогнозирование выживаемости лиофилизированных спор *Actinomyces parvullus*, основанное на методе «ускоренного хранения» / В.Д. Кузнецов, С.Н. Филиппова, С.А. Муравьева, В.М. Фишман // Микробиология. — 1977. — Т. 46. — № 2. — С. 318—323.
Kuznetsov, V.D. Prediction of survival of *Actinomyces parvullus* lyophilized spores by method of *accelerated storage* / V.D. Kuznetsov, S.N. Filippova, S.A. Muraviova, and V.M. Fishman // Mikrobiologiya (Microbiology). — 1977. — V. 46. — N 2. — P. 318—323.
18. Gill, P.E. Practical optimization. [Eds. P.E. Gill, W. Murray, M.H. Wright]. — London: Acad. Press, 1981. — 509 p.
19. Коронелли Т.В. Поступление углеводородов в клетки микроорганизмов // Усп. микробиол. — 1996. — № 6. — С. 579—585.
Koronelli, T.V. Supply of hydrocarbons into cells // Uspekhi Mikrobiologii (Proceedings in Microbiology). — 1996. — N 6. — P. 579—585.
20. Звягинцева И.С. Деградация нефтяных масел нокардиоподобными бактериями / И.С. Звягинцева, Э.Г. Суровцева, М.Н. Поглазова, В.С. Ивойлов, С.С. Беляев // Микробиология. — 2001. — № 3. — С. 321—328.
Zviagintseva, I.S. Degradation of petroleum oils by *Nocardia*-like bacteria / I.S. Zviagintseva, E.G. Surovtseva, M.N. Poglazov, V.S. Ivoilov, and S.S. Beliayev // Mikrobiologiya (Microbiology) — 2001. — N 3. — P. 321—328.
21. Rosenberg, E. High- and low-molecular-mass microbial surfactants / E. Rosenberg, E.Z. Ron // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1999. — N 52. — P. 154—162.
22. Calvo, C. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes / C. Calvo, M. Manzanera, G.A. Silva-Castro, I. Uad, J. Gonza'lez-Lo'pez // Future prospects. Sci. Total Environ. — 2009. — V. 407. — N 12. — P. 3634—3640.
23. Плешакова Е.В. Получение нефтеокисляющего биопрепарата путем стимуляции аборигенной углеводородокисляющей микрофлоры / Е.В. Плешакова, Н.Н. Позднякова, О.В. Турковская // Прикл. биохим. микробиол. — 2005. — Т. 41. — № 6. — С. 634—639.
Pleshakova, E.V. Obtaining of oil-oxidizing biopreparation by stimulation of aboriginal hydrocarbon-oxidizing microflora / E.V. Pleshakova, N.N. Pozdniakova, and O.V. Turkovskaya // Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya (Applied Biochemistry and Microbiology). — 2005. — V. 41. — N 6. — P. 634—639.
24. Сопрунова О.Б. Штаммы-деструкторы нефтяных углеводородов / О.Б. Сопрунова, М.А. Ключанова // Вестник Астраханского гос. техн. университета. — 2007. — № 1. — С. 182—183.
Soprunova, O.B. Strain destructors of oil hydrocarbons / O.B. Soprunova, and M.A. Kluyanov // Vestnik Astrakhanskogo Gos. Tekhnuniversiteta (J. Astrakhan State University of Technology). — 2007. — N 1. — P. 182—183.
25. Ветрова А.А. Сравнительная эффективность деградации нефтепродуктов консорциумом плазмидосодержащих штаммов-деструкторов и биопрепаратами “Микробак”, “БИООЙЛ” / А.А. Ветрова, А.А. Иванова, А.Е. Филонов, В.А. Забелин, И.А. Нечаева, Т.Б.Н. Ле, А.М. Боронин // Изв. Тульского гос. университета. Естественные науки. — 2013. — № 2—1. — С. 258—272.
Vetrova, A.A. Comparative efficiency of degradation of petroleum products by a consortium of plasmid-containing strain destructors and Microbac and BIOOIL biopreparations / A.A. Vetrova, A.A. Ivanova, A.E. Filonov, V.A. Zabelin, I.A. Nechaeva, T.B.N. Le, and A.M. Boronin // Izvestiya Tul'skogo Gosuniversiteta. Estestvennye Nauki (Proceedings of Tula State University. Sciences). — 2013. — N 2—1. — P. 258—272.
26. Федюкина Г.Н. Оценка свойств сухих бактериальных препаратов по данным метода ЯМР-релаксации / Г.Н. Федюкина, В.Я. Волков // Биотехнология. — 2009. — № 2. — С. 73—82.
Fedyukina, G.N. Assessment of properties of dry bacterial preparations by NMR-relaxation / G.N. Fedyukina, and V.Ya. Volkov // Biotekhnologiya (Biotechnology). — 2009. — N 2. — P. 73—82.
27. Ames, J.M. The Maillard browning reaction — an update. V. 17. — London: Chem. Ind., 1988. — P. 558—561.
28. Einarsson, H. Inhibitory mechanisms of Maillard reaction products / H. Einarsson, T. Eklund, I.F. Nes // Microbios. — 1988. — V. 53. — N 214. — P. 27—36.
29. Einarsson, H. Inhibition of bacterial growth by Maillard reaction product / H. Einarsson, B.G. Snygg, C. Eriksson // J. Agric. Food Chem. — 1983. — V. 31. — N 5. — P. 1043—1047.
30. Miyamoto-Shinohara, Y. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage / Y. Miyamoto-Shinohara, T. Imaizumi, J. Sukenobe, Y. Murakami, S. Kawamura, Y. Komatsu // Cryobiol. — 2000. — V. 41. — N 3. — P. 251—255.

V.N. FEDORENKO*, M.K. KNIAZYUK, A.I. NETRUSOV,
and A.I. SHESTAKOV

The Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
119991, Moscow Russia

e-mail: vndorenko@gmail.com

Activity of *Cobetia marina* S2 and *Nocardia coeliaca* S1 Strains in Oil Hydrocarbons Degradation and Prediction of their Survival after Lyophilization

Marine psychroactive microorganisms capable of destructing oil at 4°C have been investigated. The biosurfactant activity and decrease in the oil hydrocarbons content using *Cobetia marina* S2 и *Nocardia coeliaca* S1 cultures were determined. Based on the obtained results, it is possible to classify the given strains as promising candidates for components of biopreparations

aiming at utilization of oil pollutions in the Arctic area. The investigated cultures were preserved by lyophilization, their stability under those conditions was studied and protective characteristics of various media were compared. It was shown that sucrose in combination with dry skimmed milk is more effective in the protection of *C. marina* S2 and *N. coeliaca* S1 during lyophilization than three other investigated media. It was established that the shelf time of the bacteria preparations strongly depends on species; the predicted time of storage of the *C. marina*-containing preparation using the sucrose+dry skimmed milk medium was 5 months, whereas that for *N. coeliaca* was equal to at least 100 years. The contribution of the emulsification to the hydrocarbon degradation was also investigated, and a hypothesis of the significance of this process in the microbial utilization of oil contaminations was put forward.

Key words: accelerated stability test, bioemulsification, bioremediation, biosurfactants, freeze-drying, hydrocarbon-oxidizing activity, hydrocarbon destruction.

Biotekhnologiya (Biotechnology), V. 32, N 3, P. 9–20.

*Author for correspondence.