

УДК 579.222:579.6

## Влияние пониженной температуры на биодegradацию гексадекана бактериями-нефтедеструкторами *Rhodococcus* sp. X5, продуцирующими гликолипидные биологические поверхностно-активные вещества

© 2017 Т.М. ЛЬОНГ<sup>1</sup>, И.А. НЕЧАЕВА<sup>1</sup>, О.Н. ПОНАМОРЕВА<sup>1,\*</sup>, Х.З. ВУ<sup>1</sup>, В.А. АРЛЯПОВ<sup>1</sup>, И.Ф. ПУНТУС<sup>2</sup>, А.Е. ФИЛОНОВ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула 300012

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина», Московская область, Пушкино 142290

e-mail: olgaponamoreva@mail.ru\*

Поступила 02.03.2017 г.

Принята в печать 05.07.2017 г.

Изучено влияние пониженной температуры на процесс биодegradации *n*-гексадекана бактериями *Rhodococcus* sp. X5, входящими в биопрепарат «МикроБак». Степень дegradации *n*-алкана бактериями составила 53% и 40% при 26 °С и 10 °С, соответственно. Содержание трегалолипидных биоПАВ, продуцируемых бактериями в среду, достигало 280 мг/л при 26 °С и 100 мг/л при 10 °С. При пониженной температуре гидрофобность клеточной поверхности и содержание общих липидов было выше, чем при 26 °С: степень адгезии клеток к гексадекану составила 73% против 63%, а общее содержание клеточных липидов – 169 мг/г против 115 мг/г биомассы в экспоненциальной фазе роста. Выявлена корреляция между содержанием трегалолипидных биоПАВ, гидрофобностью клеточной поверхности, количеством общих липидов и степенью биодegradации углеводорода. Способность *Rhodococcus* sp. X5 к физиологической адаптации в условиях низких температур среды обуславливает большой метаболический потенциал бактерий при использовании их для биоремедиации нефтезагрязненных территорий, расположенных в районах с холодным климатом.

**Ключевые слова:** бактерии-нефтедеструкторы, биодegradация, гексадекан, гликолипидные биоПАВ, пониженная температура, *Rhodococcus*.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2017-33-6-49-56

Загрязнение окружающей среды углеводородами нефти является глобальной проблемой в современном мире. В последнее время особое внимание уделяется микробиологическим аспектам технологии очистки нефтезагрязненных территорий, подробно анализируются факторы, обеспечивающие наибольшую эффективность разрушения углеводородов нефти микроорганизмами [1–3]. Представители р. *Rhodococcus* являются эффективными деструкторами различных углеводородов, содержащихся в нефти; они легко

адаптируются к экстремальным условиям окружающей среды и часто входят в состав препаратов для биоремедиации загрязненных почв [4–6].

В последние годы нефтедобыча интенсивно ведется в условиях холодного климата, где восстановление загрязненных территорий происходит крайне медленно. При низких температурах многие углеводороды нефти переходят в твердое агрегатное состояние: увеличивается их вязкость, снижается растворимость, уменьшается степень диффузии, что значительно влияет на их биодоступность

Список сокращений: биоПАВ – поверхностно-активное вещество биологического происхождения; ГХ-МС – газовая хроматография–масс-спектрометрия; КЖ – культуральная жидкость; ОП<sub>600</sub> – оптическая плотность при длине волны 600 нм; тест МАТН (Microbial Adherence To Hydrocarbon) – тест на адгезию к углеводородам.

и степень деградации микроорганизмами [7–9]. Известно, что бактерии р. *Rhodococcus* продуцируют гликолипидные биоПАВ, повышающие биодоступность гидрофобных субстратов [10, 11]. В ряде работ показано, что при пониженных температурах родококки могут продуцировать биоПАВ при росте как на жидких (керосин) [12], так и на твердых (тетрадекан и *n*-гексадекан) [13, 14] углеводородных субстратах. Однако роль биоПАВ в биодеградации твердых гидрофобных субстратов при низких температурах пока мало изучена.

Штамм *Rhodococcus* sp. X5 входит в состав биопрепарата «МикроБак», разработанный для очистки нефтезагрязненных почв в интервале температур 4–30 °С [4, 9]. Ранее нами было показано, что этот штамм эффективно разрушает углеводороды нефти, продуцирует в культуральную среду сукциноилтрегалолипиды и обладает высокой степенью адгезии к *n*-гексадекану при температуре около 25 °С [15, 16].

Цель данной работы состояла в оценке потенциала бактерий *Rhodococcus* sp. X5 как компонента биопрепаратов для очистки нефтезагрязненных территорий в условиях холодного климата. Для этого выявляли эффект пониженной температуры (10 °С) на способность бактерий к продукции биоПАВ, адгезию клеток к гексадекану, содержание липидов в биомассе микроорганизмов и степень биодеградации гексадекана.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Объект исследований

Был использован штамм *Rhodococcus* sp. X5 из коллекции лаборатории биологии плазмид ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН (ВКМ Ас-2532 Д).

### Условия культивирования

Микроорганизмы культивировали в 200 мл жидкой минеральной среды Эванса [17], содержащей по 1 мл/л каждого из следующих компонентов: 50 мМ  $K_2HPO_4$ ; 5 мМ  $NH_4Cl$ ; 1 мМ  $Na_2SO_4$ ; 62 мМ  $MgCl_2$ ; 1 мМ  $CaCl_2$ ; 0,005 мМ  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ ; раствор микроэлементов (г/л:  $ZnO$  – 0,41;  $FeCl_3 \times 6 H_2O$  – 5,4;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  – 2;  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  – 0,17;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  – 0,48;  $H_3BO_3$  – 0,06), а также *n*-гексадекан (20 г/л) (ЗАО «ЭКОС-1», Россия). Родококки выращивали в колбах Эрленмейера объемом 750 мл при 26 °С или 10 °С на орбитальной качалке Excella E25 (Eppendorf, Германия) при частоте 180 об/мин. Среду в колбах инокулировали суспензией микроорганизмов до конечной концентрации  $1 \cdot 10^6$  кл/мл.

Рост микроорганизмов оценивали по изменению ОП<sub>600</sub> на фотометре «Эксперт-003» («Эконикс–Эксперт», Россия).

### Измерение поверхностного натяжения бесклеточного супернатанта

Для получения бесклеточного супернатанта клетки отделяли центрифугированием при 10000 g в течение 10 мин. Поверхностное натяжение оценивали методом Дю Нуи на тензиометре Kruss K6 (Kruss, Германия) при комнатной температуре [15].

### Определение индекса эмульгирования

Индекс эмульгирования бесклеточного супернатанта ( $E_{24}$ ) определяли по отношению высоты слоя образуемой эмульсии с гексадеканом к общей высоте жидкости в пробирке через 24 часа [18].

### Оценка содержания трегалолипидных биоПАВ в бесклеточном супернатанте

Для этой цели использовали колориметрический метод определения концентрации сахаров с помощью фенольного реактива [19]. Стандартом служил раствор трегалозы.

### Измерение гидрофобности клеточной поверхности или степени адгезии клеток к *n*-гексадекану

Данную величину определяли с использованием МАТН-теста [20] с модификацией [21].

### Определение суммарных клеточных липидов

Липиды экстрагировали полярными органическими растворителями из влажной биомассы бактерий после удаления избытка *n*-гексадекана путем экстракции гексаном (ЗАО «ЭКОС-1», Россия), согласно методике [22].

### Анализ жирнокислотного состава липидных экстрактов

Проводили переэтерификацию жирных кислот по методике, описанной в работе [23]. Метилловые эфиры жирных кислот растворяли в хлороформе и идентифицировали методом ГХ-МС на хроматографе Agilent 6890N (Agilent Technologies Inc., USA) с масс-спектрометрическим детектором Agilent 5973, (капиллярная колонка ХР-1, 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм). Метилловые эфиры жирных кислот идентифицировали с использованием электронной библиотеки масс-спектров (NIST/EPA/NIH. Mass Spectral Library [www.nist.gov/srd/nist1a.cfm](http://www.nist.gov/srd/nist1a.cfm)).

### Измерение степени деградации *n*-гексадекана бактериями *Rhodococcus* sp. X5

Процесс оценивали по убыли субстрата в среде через 3, 6, 8 и 12 сут при 26 °С и 6, 12 и 18 сут при 10 °С. Для этого из 10 мл культуральной среды экстрагировали *n*-гексадекан равным объемом гексана (10 мл) и определяли содержание *n*-гексадекана с помощью газового хроматографа «Кристалл-5000» («Хроматек-Аналитик», Россия) с капиллярной колонкой ВР1J08 (30 м × 0,3 мм × 0,53 мкм).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Деградация гексадекана бактериями *Rhodococcus* sp. X5 при температуре 26 °С и 10 °С

Способность бактерий разрушать алканы при пониженной температуре вызывает особый интерес исследователей, поскольку эффективность утилизации углеводов существенно зависит от их агрегатного состояния. Так, *n*-гексадекан, имеющий температуру плавления 18 °С, при 26 °С является жидкостью, а при 10 °С – твердым веществом. Исследование процесса деградации *n*-гексадекана штаммом *Rhodococcus* sp. X5 при различной температуре (26 °С и 10 °С) показало более высокую скорость роста штамма и более быстрое достижение стационарной фазы, при 26 °С (рис. 1). Содержание *n*-гексадекана при росте штамма *Rhodococcus* sp. X5 составила на 8-е сутки при 26 °С 53% и на 18-е сутки при 10 °С – около 40%.

Однако эффективность утилизации субстрата к началу стационарной фазы (6-е и 12-е сутки при температуре 26 °С и 10 °С, соответственно) при использовании двух температур различалась незначительно. Так, штамм *Rhodococcus* sp. X5 способен утилизировать 47% гексадекана при 26 °С на 6-е сутки и 38% при 10 °С на 12-е сутки, несмотря на то, что биодоступность твердого субстрата при низкой температуре снижается существенно.

Известно, что актинобактерии способны эффективно разрушать *n*-алканы при пониженной температуре. В работе [24] показано, что бактерии *R. cercidiphyllus* BZ22 утилизировали 35% *n*-гексадекана при температуре 10 °С в течение 14 сут, что сопоставимо с полученными нами результатами.

Авторы работы [14] изучали физиологическую адаптацию алкан-деградирующих бактерий *Rhodococcus* sp. Q15 к низким температурам и показали, что существенную роль в утили-

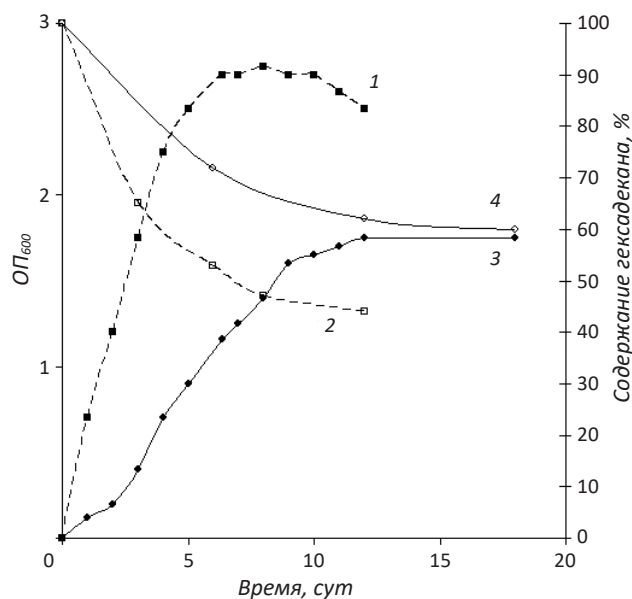


Рис. 1. Динамика роста бактерий *Rhodococcus* sp. X5 (кривые 1 и 3) и потребления ими гексадекана (кривые 2 и 4) при 26 °С и 10 °С, соответственно

Fig. 1. Dynamics of growth (curves 1 and 3) and hexadecane consumption (curves 2 and 4) by *Rhodococcus* sp. X5 strain at 26 °С and 10 °С, respectively

зации дизельного топлива при 5 °С могут играть такие механизмы, как продукция клеточно-связанных биоПАВ, увеличение гидрофобности поверхности клеток и образование внутриклеточных липидных включений. Для выяснения роли этих механизмов в адаптации нефтеутилизирующих бактерий *Rhodococcus* sp. X5 к низким температурам проводили сравнительное определение способности микроорганизмов продуцировать биоПАВ, в частности гликолипиды, а так же гидрофобности клеточной поверхности и липидного состава клеток в зависимости от температуры культивирования.

#### Влияние температуры на продукцию биоПАВ штаммом *Rhodococcus* sp. X5

Уровень продукции бактериями биоПАВ можно оценивать по эмульгирующей активности и изменению поверхностного натяжения культуральной среды. Способность бактерий к образованию эмульсий характеризует индекс эмульгирования [25], зависящий от природы и содержания биоПАВ. Установлено, что показатель  $E_{24}$  для бесклеточного супернатанта штамма *Rhodococcus* sp. X5 в стационарной фазе роста имеет более высокое значение при 26 °С (55%), чем при 10 °С (36%), что может быть обусловлено большей концентрацией биоПАВ в первом случае.

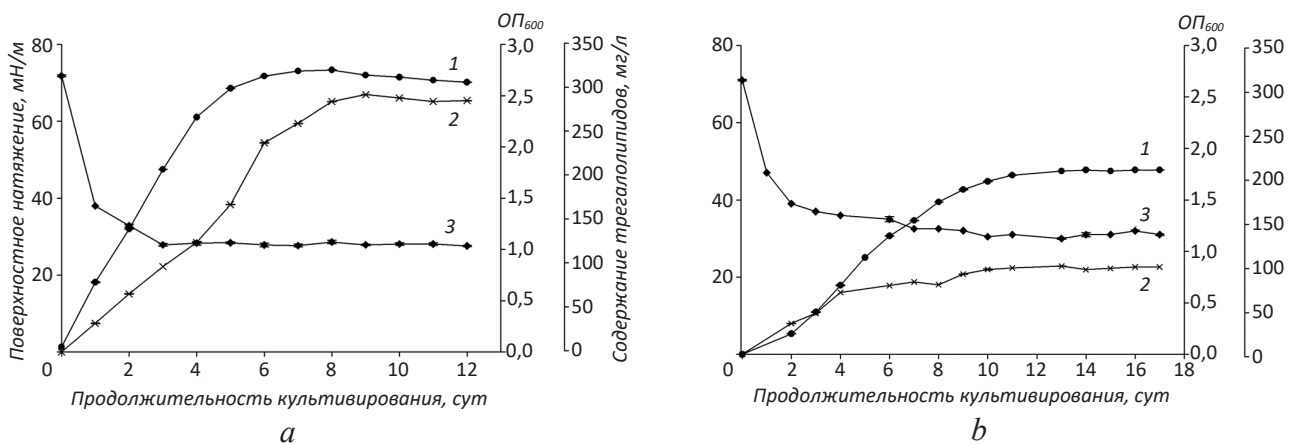
Культивирование штамма *Rhodococcus* sp. X5 на среде с гексадеканом при 26 °С приводило к резкому уменьшению поверхностного натяжения среды уже в первые сутки роста бактерий (рис. 2а). На четвертые сутки поверхностное натяжение бесклеточного супернатанта достигало 27 мН/м (при начальном значении 72 мН/м), что свидетельствовало об активной продукции биоПАВ. Ранее было показано, что *Rhodococcus* sp. X5 продуцируют трегалолипиды в культуральную среду [15], поэтому параллельно с исследованием поверхностного натяжения оценивали содержание в среде трегалолипидов. Показано, что снижение поверхностного натяжения супернатанта культуры сопровождалось увеличением концентрации в нем трегалолипидов, которая достигала максимального значения (280 мг/л) на 8-е сутки культивирования (рис. 2а, кривая 2). После того, как концентрация трегалолипидов возрастала до 120 мг/л, дальнейшее снижение поверхностного натяжения не наблюдалось, по-видимому, вследствие достижения биоПАВ критической константы мицеллообразования.

Культивирование бактерий *Rhodococcus* sp. X5 на среде с *n*-гексадеканом в течение 6 сут при температуре 10 °С приводило к снижению поверхностного натяжения среды до 35 мН/м (рис. 2б, кривая 3). Содержание трегалолипидов в бесклеточном супернатанте при этом составило 100 мг/л (см. рис. 2б, кривая 2). Уменьшение содержания внеклеточных трегалолипидных биоПАВ при 10 °С по сравнению с таковым при 26 °С может быть обусловлено образованием клеточно-свя-

занных гликолипидов, как показано в работе [14]. Клеточно-связанные биоПАВ способны формировать липофильные каналы в клеточной стенке бактерий, что увеличивает доступность гидрофобных субстратов для микроорганизмов [1, 25].

В работе [26] показано, что культивирование *Rhodococcus* sp. PLM026 при температуре 28 °С сопровождается выделением в культуральную среду до 300 мг/л трегалолипидов. При этом поверхностное натяжение среды снижалось до 29 мН/м. Авторы публикации [10] также наблюдали уменьшение поверхностного натяжения среды до 29 мН/м при росте *Rhodococcus* sp. MS11 на среде с *n*-алканами (в ряду от *n*-декана до *n*-гептадекана). Кроме того, сукциноилтрегалолипиды, выделенные из культуральной среды бактерий *R. wratislaviensis* BN38 и *Rhodococcus* sp. SD74, снижали поверхностное натяжение среды до 24 мН/м и 19 мН/м, соответственно [11, 23]. Таким образом, можно считать установленным, что в диапазоне температур 20–30 °С родококки при росте на гидрофобных субстратах продуцируют в культуральную среду трегалолипидные биоПАВ, которые эффективно снижают поверхностное натяжение среды.

Культивирование микроорганизмов в условиях пониженных температур (15 °С) продемонстрировало также способность арктических бактерий *Rhodococcus*, растущих на среде с тетрадеканом, уменьшать поверхностное натяжение культуральной среды до 27 мН/м [13]. Показано, что в условиях пониженной температуры (13 °С) поверхностное натяжение среды с керосином снижалось до 37 и 30 мН/м при росте на ней морских бактерий



**Рис. 2.** Динамика роста культуры (кривая 1), содержания в ней трегалолипидов (кривая 2) и поверхностного натяжения супернатанта КЖ (кривая 3) штамма *Rhodococcus* sp. X5 при выращивании на среде с *n*-гексадеканом при 26 °С (а) и 10 °С (б)

**Fig. 2.** Dynamics of culture growth (curve 1), trehalolipid content (curve 2) and surface tension of CL supernatant (curve 3) during *Rhodococcus* sp. X5 cultivation on hexadecane-containing medium at 26 °С (a) and 10 °С (b)

Таблица 1

**Содержание общих липидов в клетках *Rhodococcus* sp. X5 при росте на среде с *n*-гексадеканом**

Content of total lipids in *Rhodococcus* sp. X5 cells growing on *n*-hexadecane-containing medium

| Фаза роста       | Содержание общих липидов, мг/г влажной биомассы |       |
|------------------|---|-------|
|                  | 26 °С   | 10 °С |
| Экспоненциальная | 115   | 169   |
| Стационарная     | 78  | 133   |
| Замедление роста | 61  | 112   |

*Rhodococcus* sp. LF13 и LF22, соответственно [12]. В то же время, при более низкой температуре (5 °С) поверхностное натяжение бесклеточной среды бактерий *Rhodococcus* sp. Q15, растущих на среде с *n*-гексадеканом, уменьшалось незначительно – с 72 мН/м до 62 мН/м [14]. В настоящей работе продемонстрировано заметное уменьшение поверхностного натяжения среды бактериями *Rhodococcus* sp. X5 как при 26 °С, так и при 10 °С до 27 и 32 мН/м, соответственно (см. рис. 2*ab*, кривые 3), что коррелирует со способностью этих микроорганизмов продуцировать в значительном количестве гликолипидные биоПАВ.

**Влияние температуры на гидрофобность клеточной стенки и липидный состав клеток *Rhodococcus* sp. X5**

При пониженной температуре *n*-гексадекан находится в твердом агрегатном состоянии. В таких условиях важную роль в биодеградации гидрофобного субстрата играет адгезия клеток к субстрату, степень которой определяется свойствами клеточной поверхности, прежде всего, ее гидрофобностью. Степень адгезии к гексадекану составила 63% при 26 °С и 73% при 10 °С в экспоненциальной фазе роста бактерий (рис. 3).

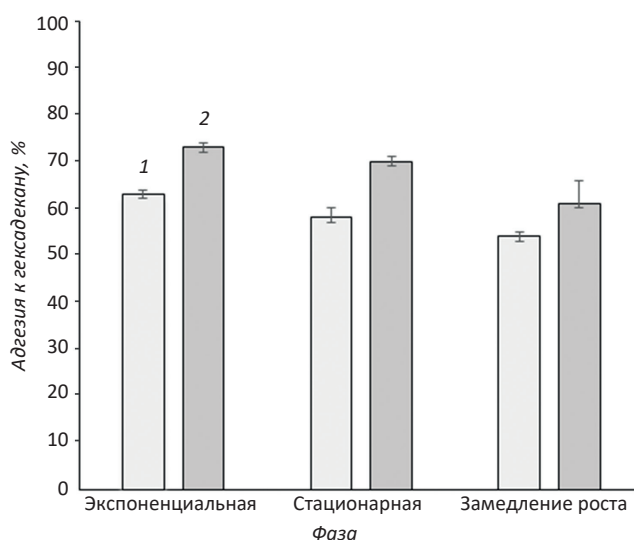
Важно отметить, что наблюдается взаимосвязь между содержанием внеклеточных гликолипидных биоПАВ и гидрофобностью клеточной поверхности родококков: увеличение содержания

трегалолипидов в среде (100 мг/л при 10 °С и 280 мг/л при 26 °С, см. рис. 2, кривые 2) приводит к уменьшению гидрофобности клеток (с 73% до 63%, рис. 3).

Таким образом, при пониженной температуре гидрофобность клеток увеличивается, что способствует их адгезии к твердому гидрофобному субстрату; однако это увеличение не так значительно, как описывают другие авторы. Ранее было показано, что адгезивная активность у некоторых штаммов родококков возрастает на 25–30% при снижении температуры культивирования только до 17 °С [27]. Такое различие может быть обусловлено эффективной продукцией штаммом *Rhodococcus* sp. X5 трегалолипидных биоПАВ в культуральную среду даже при пониженной температуре, что обеспечивает увеличение псевдорастворимости гексадекана и облегчает его поступление в клетки микроорганизмов.

Содержание клеточных липидов при росте бактерий *Rhodococcus* sp. X5 на среде с *n*-гексадеканом значительно выше при 10 °С, чем при 26 °С; например, в экспоненциальной фазе роста эта величина составляет 169 и 115 мг/г биомассы, соответственно (табл. 1). Увеличение содержания липидов свидетельствует о накоплении гидрофобных субстратов в клетках бактерий, что является одним из механизмов физиологической адаптации алкан-деградирующих родококков [14].

В составе липидов клеток *Rhodococcus* sp. X5 как при 26 °С, так и при 10 °С среди насыщенных жирных кислот высока была доля гексадекановой кислоты (36% и 33%, соответственно), которая является промежуточным метаболитом *n*-гексадекана (табл. 2). Однако при 10 °С клетки бактерий синтезировали больше ненасыщенных жирных кислот, представленных преимущественно



**Рис. 3.** Гидрофобность клеточной поверхности бактерий *Rhodococcus* sp. X5, выращенных на среде с *n*-гексадеканом. 1 – при температуре 26 °С; 2 – 10 °С

**Fig. 3.** Hydrophobicity of cell surface of *Rhodococcus* sp. X5 bacteria grown on *n*-hexadecane-containing medium at 26 °С (1) and 10 °С (2)

Таблица 2

**Жирнокислотный состав общих липидов клеток *Rhodococcus* sp. X5 (%) при росте в среде с *n*-гексадеканом**

Fatty acid content of *Rhodococcus* sp. X5 total lipids (%) when grown on hexadecane-containing medium

| Кислоты                  | 26 °С | 10 °С |
|--------------------------|-------|-------|
| Насыщенные               |       |       |
| остановая                | –     | 2     |
| декановая                | –     | 8     |
| додекановая              | 6     | –     |
| тетрадекановая           | 13    | 7     |
| пентадекановая           | 10    | 2     |
| гексадекановая           | 36    | 33    |
| Насыщенная разветвленная |       |       |
| 15-метил-гексадекановая  | 12    | 9     |
| Ненасыщенная             |       |       |
| 9-гексадеценная          | 23    | 39    |

9-гексадеценной кислотой (39%), в то время как при 26 °С доля этой кислоты составляла только 23% (см. табл. 2). Эти результаты подтверждают полученные ранее данные [14] о том, что психротрофные бактерии р. *Rhodococcus* при росте на гидрофобных субстратах могут адаптироваться к низким температурам среды благодаря увеличению содержания общих липидов и ненасыщенных жирных кислот, в частности, 9-гексадеценной кислоты. Известно, что образование ненасыщенных липидов компенсирует снижение текучести мембран при низкотемпературном стрессе. Изменение состава жирных кислот может быть связано с синтезом новых липидов в присутствии гидрофобных субстратов [28].

Таким образом, изученные в работе свойства *Rhodococcus* sp. X5 взаимосвязаны и укладываются в рамки общепринятых механизмов физиологической адаптации актинобактерий к деградации гидрофобных углеводородных субстратов при пониженной температуре. В заключение следует отметить, что, несмотря на твердое агрегатное состояние гексадекана при 10 °С, эффективность его деградации бактериями *Rhodococcus* sp. X5 при этой температуре остается высокой (см. рис. 1). Особенностью данного штамма является значительный уровень высвобождения в культуральную среду даже при низких температурах гликолипид-

ных биоПАВ, которые обеспечивают увеличение псевдорастворимости гидрофобного субстрата, с одной стороны, и способствуют адгезии бактерий к гидрофобной поверхности твердого гексадекана, с другой. Особенности физиологической адаптации бактерий *Rhodococcus* sp. X5 к низким температурам среды определяют их высокий потенциал как компонента эффективных биопрепаратов для очистки нефтезагрязненных территорий в условиях холодного климата. Полученные результаты могут быть использованы для целенаправленной разработки таких биопрепаратов.

Результаты исследования опубликованы при финансовой поддержке ТулГУ в рамках научного проекта № 8709.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Matvyeyeva O.L., Vasylchenko O.A., Alieva O.R. Microbial biosurfactants role in oil products biodegradation. *Int. J. Environ. Bioremediation Biodegradation*, 2014, 2(2), 69–74. doi: 10.12691/ijebb-2-2-4
2. Lawniczak L., Marecik R., Chrzanowski L. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, 97(6), 2327–2339. doi: 10.1007/s00253-013-4740-1
3. Souza E.C., Vessoni-Penna T.C., De Souza Oliveira R.P. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *Int. Biodeterioration Biodegradation*, 2014, 89, 88–94. doi: 10.1016/j.ibiod.2014.01.007
4. Filonov A., Ovchinnikova A., Vetrova A., et al. Oil-spill bioremediation, using a commercial biopreparation “MicroBak” and a consortium of plasmid-bearing strains “V&O” with associated plants. In: Introduction to enhanced oil recovery (EOR) processes and bioremediation of oil-contaminated sites [Ed. L. Romeo-Zeron]. In Tech. 2012, 291–318.
5. Делеган Я.А., Ветрова А.А., Титок М.А., Филонов А.Е. Разработка консорциума термотолерантных бактерий как основы биопрепарата для ремедиации нефтезагрязненных грунтов и вод в жарком климате. *Биотехнология*, 2016, (1), 53–64. doi: 10.21519/0234-2758-2016-1-53-64
6. Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen C.C. Biodegradation by members of the genus *Rhodococcus*: biochemistry, physiology, and genetic adaptation. *Adv. Appl. Microbiol.*, 2006, 59, 1–29. doi: 10.1016/S0065-2164(06)59001-X
7. Rojo F. Degradation of alkanes by bacteria. *Environ. Microbiol.*, 2009, 11(10), 2477–2490. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x
8. Федоренко В.Н., Сережкин И.Н., Ламова Я.А., и др. Свойства естественных углеводородокисляющих микробных сообществ для утилизации нефтяных

- загрязнений в Северных регионах, *Биотехнология*, 2015, (6), 72–78. doi: 10.21519/0234-2758-2015-6-72-78
9. Пырченкова И.А., Гафаров А.Б., Пунтус И.Ф., и др. Выбор и характеристика активных психротрофных микроорганизмов-деструкторов нефти, *Прикладная биохимия биотехнология*, 2006, 42(3), 298–305.
  10. Rapp P., Gabriel-Jurgens L.H. Degradation of alkanes and highly chlorinated benzenes, and production of biosurfactants, by a psychrophilic *Rhodococcus* sp. and genetic characterization of its chlorobenzene dioxygenase, *Microbiology*, 2003, 149, 2879–2890. doi: 10.1099/mic.0.26188-0
  11. Tuleva B., Christova N., Cohen R., et al. Production and structural elucidation of trehalose tetraesters (biosurfactants) from a novel alkanotrophic *Rhodococcus wratislaviensis* strain, *J. Appl. Microbiol.*, 2008, 104(6), 1703–1710. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03680.x
  12. Dang N.P., Landfald B., Willassen N.P. Biological surface-active compounds from marine bacteria, *Environ. Technol.*, 2016, 37 (9), 1151–1158. doi: 10.1080/09593330.2015.1103784
  13. Malavenda R., Rizzo C., Michaud L., et al. Biosurfactant production by Arctic and Antarctic bacteria growing on hydrocarbons, *Polar Biology*, 2015, 38(10), 1565–1574. doi: 10.1007/s00300-015-1717-9
  14. Whyte L.G., Hawari J., Zhou E., et al. Physiological adaptations involved in alkane assimilation at a low temperature by *Rhodococcus* sp. strain Q15, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65(7), 2961–2968.
  15. Petrikov K., Delegan Ya., Surin A., Pomamoreva O., et al. Glycolipids of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* oil-degrading bacteria used in bioremediation preparations: Formation and structure, *Process Biochemistry*, 2013, 48 (5–6), 931–935. doi: 10.1016/j.procbio.2013.04.008
  16. Лыонг Т.М., Нечаева И.А., Петриков К.В., и др. Бактерии-нефтедеструкторы рода *Rhodococcus* - потенциальные продуценты биоПАВов, *Известия ВУЗОВ. Приклад. химия и биотехн.*, 2016, (1), 50–60.
  17. Evans C.G.T., Herbert D., Tempest D.W. The continuous culture of microorganisms. Construction of a chemostat. In: *Methods in microbiology*. V.2. [Eds. J.R. Norris, D.W. Ribbons]. London: Acad. Press, 1970, 277–327. doi: 10.1016/S0580-9517(08)70227-7
  18. Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, 53(2), 224–229.
  19. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, 1956, 28(3), 350–356. doi: 10.1021/ac60111a017
  20. Rosenberg M. Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity, *FEMS Microbiology Letter*, 1984, 22(3), 289–295. doi: 10.1111/j.1574-6968.1984.tb00743.x
  21. Satpute S.K., Banpurkar A.G., Dhkephalkar P.K. et al. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2010, 30(2), 127–144. doi:10.3109/07388550903427280
  22. Cortes M.A., de Carvalho C.C. Effect of carbon sources on lipid accumulation in *Rhodococcus* cells. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, 94, 100–105. doi: 10.1016/j.bej.2014.11.017
  23. Tokumoto Y., Nomura N., Uchiyama H. et al. Structural characterization and surface-active properties of a succinoyl trehalose lipid produced by *Rhodococcus* sp. SD-74, *J. Oleo Sci.*, 2009, 58(2), 97–102. doi: 10.5650/jos.58.97
  24. Margesin R., Moertelmaier C., Mair J. Low-temperature biodegradation of petroleum hydrocarbons (n-alkanes, phenol, anthracene, pyrene) by four actinobacterial strains, *Int. Biodeterioration Biodegradation*, 2013, 84, 185–191. doi: 10.1016/j.ibiod.2012.05.004
  25. Franzetti A., Bestetti G., Caredda P. et al. Surface-active compounds and their role in the access to hydrocarbons in *Gordonia* strains, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2008, 63(2), 238–248. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00406.x
  26. White D.A., Hird L.C., Ali S.T. Production and characterization of a trehalolipid biosurfactants produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp., strain PML026, *J. Appl. Microbiol.*, 2013, 115(3), 744–755. doi: 10.1111/jam.12287
  27. Рубцова Е.В., Куюкина М.С., Ившина И.Б. Влияние условия культивирования на адгезию родококков в отношении к н-гексадекану, *Прикладн. биохим. микробиол.*, 2012, 48(5), 501–509.
  28. de Carvalho C.C.C.R., Wick L.Y., Heipieper H.J. Cell wall adaptations of planktonic and biofilm *Rhodococcus erythropolis* cells to growth on C5 to C16 n-alkane hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 82(2), 311–320. doi: 10.1007/s00253-008-1809-3

## Effect of Low Temperature on Hexadecane Biodegradation by Oil-Degrading Bacteria *Rhodococcus* sp. X5 Capable of Producing Glycolipid Biosurfactants

T.M. LUONG<sup>1</sup>, I.A. NECHAEVA<sup>1</sup>, O.N. PONAMOREVA<sup>1,\*</sup>, H.G. VU<sup>1</sup>, A.V. ARLYAPOV<sup>1</sup>, I.F. PUNTUS<sup>2</sup>, A.E. FILONOV<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>The Tula State University, 300012, Tula Russia

<sup>2</sup>The Skryabin Institute for Biochemistry and Physiology of Microorganisms, 142290, Pushchino, Moskovskaya Oblast Russia

e-mail: olgaponamoreva@mail.ru\*

Received March 02, 2017

Accepted July 05, 2017

**Abstract**—The influence of low temperature on the process of the *n*-hexadecane biodegradation by a *Rhodococcus* sp. X5 strain, a constituent of the MikroBak biopreparation, has been studied. The degrees of hexadecane degradation by the bacteria were 53% and 40% at 26 °C and 10 °C, respectively. The contents of trehalolipid biosurfactants produced by the bacteria reached 280 mg/L at 26°C and 100 mg/L at 10 °C. The cell surface hydrophobicity and total lipid content were higher at low temperature than at 26 °C: the rates of adhesion to hexadecane were 73% and 63%, and the amounts of total cellular lipids reached 169 mg/g and 115 mg/g of biomass at 10 °C and 26 °C, respectively. The correlation in the content of trehalolipid biosurfactants, cell surface hydrophobicity, content of total lipids and degree of biodegradation was established. The capacity of the physiological adaptation to low temperatures in the *Rhodococcus* sp. X5 bacteria determines their high potential for the bioremediation of oil-polluted territories in cold climates.

*Key words:* oil-degrading bacteria, biodegradation, hexadecane, glycolipid biosurfactants, low temperature, *Rhodococcus*.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2017-33-6-49-56