

УДК 579.222

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ЭКСТРАКТОВ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ *Acinetobacter calcoaceticus* И ИХ ДЕЙСТВИЕ НА pSoxS-lux БИОСЕНСОР

© 2011 г. И. С. Сазыкин*, В. Н. Прокофьев*, В. А. Чистяков*, М. А. Сазыкина*, В. В. Внуков**

* Научно-исследовательский институт биологии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, 344090
e-mail: zebra-sis@yandex.ru

** Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, 344006

Поступила в редакцию 24.08.2010 г.

Исследована H_2O_2 -люминол-индуцированная хемилюминесценция (ХЛ) и Fe(II)-индуцированная ХЛ экстрактов двух штаммов морских нефтеокисляющих бактерий *Acinetobacter calcoaceticus*, выращенных на среде, содержащей нефть, и среде без нефти. Определено действие экстрактов на биосенсор *E. coli* MG 1655 (pSoxS-lux). В присутствии нефти выявлен эффект усиления H_2O_2 -индуцированной люминолзависимой ХЛ, что свидетельствует об увеличении уровня свободнорадикального окисления липидов. В системе Fe(II)-индуцированной ХЛ водные экстракты, полученные из микроорганизмов, выращенных в присутствии нефти, продемонстрировали усиление генерации АФК. Опыты с ацетон-этанольными экстрактами показали активизацию антиоксидантных систем обоих штаммов. Исследование в биологической системе регистрации с использованием биосенсора *E. coli* MG 1655 (pSoxS-lux) показало, что в составе водных экстрактов изучаемых штаммов, выращенных на среде без нефти, присутствовали вещества, способные снижать уровень свободнорадикального окисления.

В последние годы стали появляться работы [1–3], в которых рассматривается совместное применение при ремедиации загрязненных углеводородами грунтов как биологической, так и химической обработки. Последняя включает окисление поллютантов при помощи пероксида водорода или процессов, подобных реакции Фентона, протекающих при естественном рН почвы. При этом идет образование гидроксильного радикала ($\bullet OH$), супероксид-анион радикала ($O_2^{\bullet -}$) и гидропероксидного радикала (HO_2^{\bullet}). В этих работах авторы отмечали заметно меньшую эффективность отдельных только химической обработки или микробиологической деградации углеводородов по сравнению с комплексной обработкой, включающей как свободнорадикальное окисление, так и последующую биodeградацию углеводородов. Кроме того, было обнаружено резкое увеличение биологической доступности и уровня деградации тяжелых фракций углеводородов. Комплексная химико-биологическая обработка происходила при естественных значениях рН почвы и в качестве биодеструкторов выступали аборигенные микроорганизмы.

Хорошо известны углеводород-редуцирующие микроорганизмы, активно выделяющие в окружающую среду пероксид водорода. Очевидна важность этого механизма для конкурентной межвидовой борьбы и показана его роль в образовании биопленок [4], но не показан потенциальный вклад в ферментативное окисление углеводородов. образова-

ние пероксида водорода при переносе 2 электронов на молекулу кислорода характерно для некоторых ферментов, содержащих флаavin (глюкозооксидаза, ксантинооксидаза, оксидазы аминокислот). Эти ферменты восстанавливают O_2 до иона пероксида O_2^{2-} , который, реагируя с протонами, образует H_2O_2 . Так как ферменты, содержащие флаavin, есть у многих микроорганизмов, становится очевидным, что многие из них являются продуцентами пероксида водорода в заметных количествах и потенциально могут принимать участие в деградации углеводородов.

Косвенно в пользу продукции активных форм кислорода нефтередуцирующими микроорганизмами говорит и наличие связанных с метаболизмом углеводородов пероксидаз, индуцируемых углеводородами [5–7].

Като с соавт. [8] показали, что в термофильной бактерии *Geobacillus thermoleovorans* В23 в процессе инкубации с алканами индуцируются ацетил-КоА-оксидаза, каталаза и супероксиддисмутаза. На начальном этапе β -окисления алканов при действии ацетил-КоА-оксидазы образуются активные формы кислорода (АФК), а каталаза и супероксиддисмутаза (СОД) защищают клетку от токсического действия АФК. Эти процессы функционально сходны с происходящими в пероксисомах эукариот.

Большой интерес в связи с этим представляет изучение прооксидантных и антиоксидантных соединений, продуцируемых нефтеокисляющими микроорганизмами.

В нашей работе представлены результаты исследования, целью которого являлся анализ вклада процессов свободнорадикального окисления в разложение нефти микроорганизмами.

Цель работы – оценка общего прооксидантного и антиоксидантного потенциала *Acinetobacter calcoaceticus* штаммов № 6 и № 13.

МЕТОДИКА

Использованы 2 штамма микроорганизмов, отобранных на месте аварии танкера в Керченском проливе в ноябре 2007 г., идентифицированные как *Acinetobacter calcoaceticus* (№ 6 и № 13). Штаммы были выделены путем инкубации проб воды и водных экстрактов донных отложений в минеральной среде Ворошиловой–Диановой [9] (NH_4NO_3 – 1.0 г/л; K_2HPO_4 – 1.0 г/л; KH_2PO_4 – 1.0 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2 г/л; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.02 г/л; насыщенный раствор $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 200 мкл/л) с добавлением 3% сырой нефти Октябрьского месторождения Ростовской области в качестве единственного источника углерода в течение 10 сут. Затем, для получения чистых культур, материал был посеян на плотную питательную среду, которая была получена добавлением к жидкой среде Ворошиловой–Диановой 2% агара, 0.1% Твин-80 и 2% сырой нефти. Оба штамма являются каталазоположительными.

Идентификация микроорганизмов была проведена во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов ГосНИИГенетика при помощи секвенирования переменных участков гена рибосомальной 16S РНК (<http://www.genetika.ru/vkpm/uslugi-vkpm/>).

Бесклеточные экстракты микроорганизмов готовили с использованием физиологического раствора и смеси органических растворителей. Для этого культуры микроорганизмов выращивали в жидкой среде на термостатируемой качалке ES-20 (“Biosan”, Латвия) при 30°C и 200 об/мин в течение 72 ч. Для выращивания использовали богатую среду LB [10] (триптон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl – 10 г/л). Для исследования воздействия углеводов использовали среду LB с добавлением 2% нефти. Бактериальную массу собирали центрифугированием в течение 15 мин (6500 g, 4°C). Для дальнейшего использования клетки микроорганизмов трижды отмывали 0.85%-ным раствором NaCl.

Отмытые клетки использовали для получения экстрактов из бактериальной массы обоих штаммов на основе водного (раствор 0.85% NaCl и 0.1% Трипон Х100 в деионизированной воде) или органического экстрагента (смесь ацетон–этанол 1 : 1). Биомассу растирали с измельченным стеклом в присутствии экстрагента в течение 15 мин в фарфоровой ступке при +4°C.

Определение интенсивности хемилюминесценции (ХЛ) в бактериальных экстрактах в системе

H_2O_2 -люминол-индуцированной ХЛ проводили на установке для регистрации ХЛ на базе сцинтилляционного счетчика масс-спектрометра RFT 22028 (“RFT”, Германия) по методу Шестакова [11].

Измерение Fe(II)-индуцированной ХЛ проводили следующим образом: суспензию желточных липопротеидов получали путем разведения желтка куриного яйца в дистиллированной воде в соотношении 1 : 10. Для активации ХЛ применяли флуоресцирующий краситель родамин 6Ж [12].

В измерительную кювету помещали 3 мл 25 мМ К-фосфатного буфера, pH 7.7, 50 мкл суспензии желтка, 50 мкл 1 мМ раствора родамина 6Ж и 100 мкл воды (контроль) или экстракт бактериальной массы (опыт), нормированный по содержанию белка. Пробу термостатировали при постоянном перемешивании в течение 100 с при 37°C, регистрируя фоновое свечение, после чего для иницирования ХЛ в систему вводили 500 мкл 0.02 М водного раствора $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и регистрировали уровень ХЛ до достижения максимума свечения медленной вспышки. Раствор сернокислого железа готовили перед опытом и предварительно для предотвращения самоокисления подкисляли 0.1 н. HCl из расчета 200 мкл кислоты на 10 мл водного раствора соли железа.

Водные экстракты были протестированы с биосенсором *Escherichia coli* MG 1655 (pSoxS-lux) [13] в присутствии 1×10^{-2} М метилвиологена, который эффективно вызывает окислительный стресс в клетках данного биосенсора. Бактериальный биосенсор предоставлен Мануховым И.В. (ГосНИИГенетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва). Измерения бактериальной люминесценции проводились на микропланшетном люминометре LM-01T (“Immunotech”, Чехия).

Все измерения проведены в трех повторностях, статистическую обработку проводили по методу Кокунина [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование H_2O_2 -индуцированной люминолазависимой ХЛ. Мы предположили, что микробиологическая биодegradация нефтепродуктов происходит при участии свободных радикалов, продуцируемых культурой бактерий. Поэтому следовало ожидать на фоне высокой устойчивости липидного компонента бактериальных экстрактов увеличение уровня свободнорадикального окисления в системе. Для проверки данного предположения были исследованы водные и ацетон–этанольные экстракты штаммов *A. calcoaceticus* № 6 и № 13, выращенных на стандартной питательной среде (контроль) и среде, содержащей 2% нефти (опыт).

При исследовании водных экстрактов данных штаммов бактерий, выращенных на среде с нефтью, выявлен эффект усиления H_2O_2 -индуцированной люминолазависимой ХЛ как по высоте быстрой

Таблица 1. Показатели H_2O_2 -индуцированной люминолзависимой ХЛ водных экстрактов штаммов *A. calcoaceticus* № 6 и № 13

Образец		Быстрая вспышка, усл. ед.	Светосумма, с	
			100	500
Штамм № 6	контроль	240 ± 35.3	51 ± 6.8	166 ± 18.8
	опыт	740 ± 86.4*	131 ± 15.7*	318 ± 37.4*
Штамм № 13	контроль	18 ± 2.9	2 ± 0.01	10 ± 1.3
	опыт	151 ± 20.7*	13 ± 2.3*	23 ± 2.65*

* Отличия от контроля статистически значимы (t – критерий, $p < 0.05$).

Таблица 2. Показатели H_2O_2 -индуцированной люминолзависимой ХЛ ацетон-этанольных экстрактов штаммов *A. calcoaceticus* № 6 и № 13

Образец		Быстрая вспышка, усл. ед.	Светосумма, с	
			100	500
Штамм № 6	контроль	103 ± 11.3	291 ± 33.4	1006 ± 88.8
	опыт	108 ± 12.4	253 ± 26.2	1543 ± 137.7*
Штамм № 13	контроль	95 ± 8.7	112 ± 10.8	532 ± 75.6
	опыт	101 ± 9.9	166 ± 17.7	1332 ± 150.0*

* Отличия от контроля статистически значимы (t – критерий, $p < 0.05$).

вспышки (208–700%), так и по светосумме за 100 и 500 с свечения по сравнению с экстрактами микроорганизмов, выращенных без нефти (табл. 1).

Исследование ацетон-этанольных экстрактов данных штаммов, выращенных на среде, содержащей нефть, также свидетельствует об усилении интенсивности H_2O_2 -индуцированной люминолзависимой ХЛ, проявляемой в увеличении светосуммы за 500 с на 53% для штамма № 6 и на 250% – для штамма № 13 (табл. 2).

Таким образом, выращивание бактерий данных штаммов на среде, содержащей нефтепродукты, приводило к увеличению прооксидантных свойств экстрактов бактериальных клеток и, очевидно, к усилению образования АФК у данных микроорганизмов.

Исследование Fe(II)-индуцированной люминолзависимой ХЛ. Для поддержания динамического равновесия между уровнем свободнорадикального окисления и антиоксидантной активностью должна существовать достаточно сильная антиоксидантная защита, чтобы деградация углеводов нефти проходила без негативных последствий для самой бактериальной клетки. Использование фосфолипидов яичного желтка в качестве субстрата для окисления в системе Fe(II)-индуцированной ХЛ позволяет определить баланс между накоплением активных соединений кислорода и активностью антиоксидантных систем бактериальных штаммов.

Для этого исследовали влияние водных экстрактов штаммов *A. calcoaceticus* № 6 и № 13, выращенных на среде без нефти (контроль), и среде, содержащей нефть (опыт). Сравнение динамики ХЛ выявило увеличение светосуммы быстрой вспышки на 63% для штамма № 6 и на 41% – для штамма № 13, что свидетельствовало об увеличении содержания гидроперекисей липидов (табл. 3).

В то же время сократился индукционный период на 74% для штамма № 6 и на 87% для штамма № 13, что указывало на возрастание скорости окисления ионов двухвалентного железа.

Увеличивается время выхода на максимум свечения и светосуммы до наступления максимума свечения медленной вспышки для штамма № 6 на 15% и 26%, для штамма № 13 на 140% и 400% соответственно. Возрастает высота медленной вспышки на максимуме свечения для штамма № 6 на 15% и для штамма № 13 – на 300%.

Таким образом, водные экстракты данных штаммов, выращенных на среде, содержащей нефть, вызывают возрастание хемилюминесцентного ответа по медленной вспышке, что свидетельствует об усилении образования свободных радикалов, способствующих деградации углеводов нефти.

Исследование хемилюминесцентного ответа ацетон-этанольных экстрактов штаммов *A. calcoaceticus*, выращенных на среде, содержащей нефть (опыт), в отличие от выращенных на питательной среде без нефти (контроль), выявило возрастание антиокси-

Таблица 3. Показатели Fe(II)-индуцированной ХЛ водных экстрактов штаммов *A. calcoaceticus* № 6 и № 13

Образец		Индукционный период, с	Светосумма за 500 с	Время выхода на максимум свечения медленной вспышки, с	Светосумма медленной вспышки до максимума	Уровень ХЛ на 500 с медленной вспышки, усл. ед.	Высота медленной вспышки, усл. ед.	Светосумма за 100 с от введения соли железа
Штамм № 6	контроль	1560 ± 200.4	59 ± 6.8	4000 ± 387.4	832 ± 94.7	6 ± 1.0	65 ± 9.3	19 ± 2.8
	опыт	400 ± 68.8*	50 ± 7.2	4600 ± 510.3	1049 ± 121.1	6 ± 1.0	75 ± 9.9	31 ± 2.9*
Штамм № 13	контроль	2300 ± 388.5	56 ± 7.1	1200 ± 158.5	150 ± 23.4	8 ± 1.2	35 ± 7.8	22 ± 2.3
	опыт	300 ± 51.3*	46 ± 5.4	2900 ± 360.3*	750 ± 83.2*	10 ± 0.8	140 ± 23.1*	31 ± 3.6

* Отличия от контроля статистически значимы (t – критерий, $p < 0.05$).

Таблица 4. Показатели Fe(II)-индуцированной ХЛ ацетон-этанольных экстрактов штаммов *A. calcoaceticus* № 6 и № 13

Образец		Индукционный период, с	Светосумма за 500 с	Время выхода на максимум свечения медленной вспышки, с	Светосумма медленной вспышки до максимума	Уровень ХЛ на 500 с медленной вспышки, усл. ед.	Высота медленной вспышки, усл. ед.	Светосумма за 100 с от введения соли железа
Штамм № 6	контроль	4200 ± 408.1	36 ± 5.5	1600 ± 180.0	90 ± 12.4	17 ± 12.5	28 ± 3.5	0
	опыт	5400 ± 520.0	3 ± 0,6*	1500 ± 167.0	7 ± 0,9*	1 ± 1.1*	2 ± 0.28*	0
Штамм № 13	контроль	4140 ± 400.0	30 ± 3.9	800 ± 100.0	125 ± 16.4	30 ± 4.2	35 ± 4.8	3 ± 0.45
	опыт	5500 ± 510.5	15 ± 2.1*	600 ± 69.9	20 ± 2.9*	10 ± 1.6*	15 ± 1.9*	0*

* Отличия от контроля статистически значимы (t – критерий, $p < 0.05$).

дантных свойств как для штамма № 6, так и для штамма № 13, выражающееся в увеличении индукционного периода на 29–33% и уменьшении остальных показателей ХЛ (табл. 4).

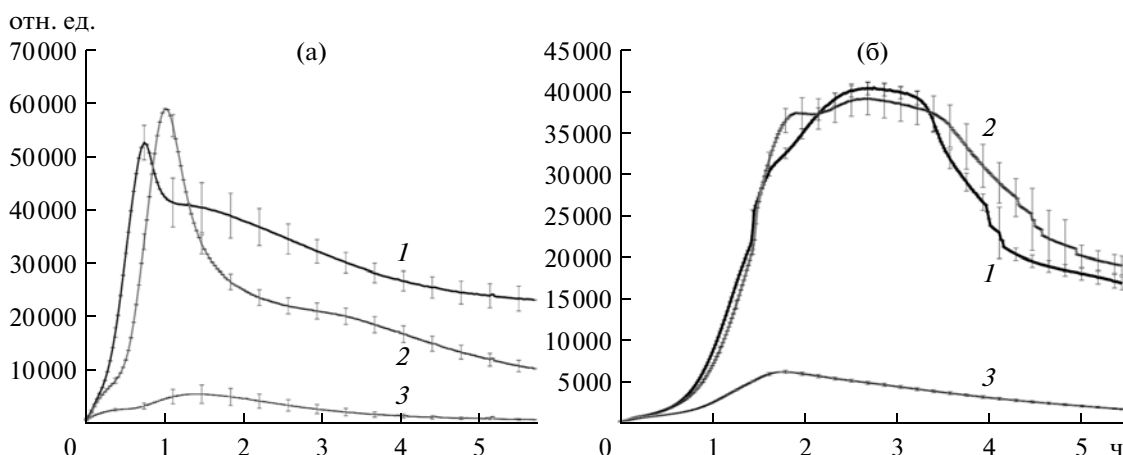
Водные экстракты исследуемых штаммов также были протестированы в биологической системе регистрации с биосенсором *E. coli* MG 1655 (pSoxS-lux), реагирующим на повышение уровня супероксид-анион радикала в клетке, то есть на соединения, индуцирующие окислительный стресс.

Необходимо отметить, что водные экстракты бактериальной массы этих штаммов, выращенных на среде без нефти, значительно снижают уровень генерации АФК, вызванный метилвиологеном в клетках Sox-lux биосенсора. Экстракт штамма № 6 снижал ответ биосенсора *E. coli* MG 1655 (pSoxS-lux) при воздействии метилвиологена в 10 раз (рисунок, а), а экстракт штамма № 13 – в 8 раз (рисунок, б). Экстракты клеток этих штаммов, выращенных на среде с нефтью, не снижали окислительный стресс по сравнению с контролем, а в определенные моменты времени даже увеличивали ответ биосенсора.

Результаты, на первый взгляд, противоречат данным по ХЛ, полученным с бесклеточными экстрактами, однако мы можем предположить наличие конститутивного синтеза антиоксидантов для защиты клетки от АФК. При выращивании микроорганизмов в присутствии нефти, уровень антиоксидантов может падать за счет нейтрализации АФК либо их действие компенсируется возросшим уровнем синтеза прооксидантных соединений в клетке.

Таким образом, можно утверждать, что клетки обоих штаммов *A. calcoaceticus* при выращивании в среде, содержащей сырую нефть, образуют прооксиданты, провоцирующие окислительный стресс в клетках Sox-lux биосенсора и продуцирующие активные формы кислорода. С другой стороны, эти же штаммы образуют антиоксиданты, защищающие клетки биосенсора от окислительного стресса и снижающие ХЛ-ответ при индукции Fe(II). По всей видимости, функцией этих антиоксидантов является защита нефтедеградирующих микроорганизмов от производимых ими же АФК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и образования РФ (проект по



Хемилюминесценция биосенсора *E. coli* MG 1655 (pSoxS-lux) под действием метилвиологена в отсутствие (контроль, 1) и в присутствии экстрактов *A. calcoaceticus* штамма №6 (а) и №13 (б), выращенных на среде с нефтью (2) и без нефти (3).

аналитической ведомственной целевой программе “Развитие научного потенциала высшей школы (2009–2010 годы)”, грант № 2.1.1/5232).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Goi A., Kulik N., Trapido M. // *Chemosphere*. 2006. V. 63. № 10. P. 1754–1763.
- Ndjou'oua A.-Cl., Cassidy D. // *Chemosphere*. 2006. V. 65. № 9. P. 1610–1615.
- Palmroth M.R.T., Langwaldt J.H., Aunola T.A., Goi A., Münster U., Puhakka J.A., Tuhkanen T.A. // *Biodegradation*. 2006. V. 17. № 2. P. 29–39.
- Mai-Prochnow A., Lucas-Elio P., Egan S., Thomas T., Webb J.S., Sanchez-Amat A., Kjelleberg S. // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190. № 15. P. 5493–501.
- Wang R.-F., Wennerstrom D., Cao W.-W., Khan A.A., Cerniglia C.E. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. P. 4300–4304.
- Godocíková J., Boháčová V., Zámocký M., Polek B. // *Folia Microbiol (Praha)*. 2005. V. 50. № 2. P. 113–118.
- Bekerman R., Segal G., Ron E. Z., Rosenberg E. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. V. 66. № 5. P. 536–541.
- Kato T., Miyanaga A., Kanaya S., Morikawa M. // *BMC Microbiol.* 2009; V. 9 : 60. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/60>.
- Родина А.Г. // *Методы водной микробиологии*. М.: Наука, 1965. 363 с.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. // *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 pp.
- Шестаков В.А., Бойчевская Н.О., Шерстнев М.П. // *Вопросы мед. химии*. 1979. № 2. С. 132–137.
- Шерстнев М.П. // *Вопросы хемилюминесценции*. 1990. Т.1. № 1. С.19–21.
- Zavilgelsky G.B., Kotova V.Yu., Manukhov I.V. // *Mutat. Res.* 2007. V. 634. № 1–2. P. 172–176.
- Кокунин В. А. // *Укр. биохим. журн.* 1975. Т. 47. № 6. С. 776–790.

Chemiluminescence Analysis of Oil Oxidizing Bacteria *Actinobacter calcoaceticus* Extracts: Effects of the Extracts on pSoxS-lux Biosensor

I. S. Sazykin^a, V. N. Prokofiev^a, V. A. Chistyakov^a, M. A. Sazykina^a, and V. V. Vnukov^b

^a Southern Federal University, Research Institute for Biology, Rostov-on-Don, 344090, Russia

e-mail: zebra-sis@yandex.ru

^b Southern Federal University, Department of Biology and Soil Sciences, Rostov-on-Don, 344006, Russia

Received August 24, 2010

Abstract—A comparative H₂O₂-luminol- and Fe(II)-induced chemiluminescence analysis of extracts of two strains of marine oil oxidizing bacteria *Actinobacter calcoaceticus* cultivated either in the presence or absence of oil was carried out. Effects of these extracts on *E. coli* MG1655 biosensor (pSoxS-lux) were studied. Activation of H₂O₂-induced chemiluminescence in the presence of oil was observed. This suggests activation of free radical lipid peroxidation. Aqueous extracts of microorganisms cultivated in the presence of oil were shown to activate reactive oxygen species production (ROS) in Fe(II)-induced chemiluminescence reaction mixture. Acetone–ethanol extracts induced antioxidative systems of both strains. Chemiluminescence analysis in a biological system carried utilizing *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux) revealed that aqueous extracts of the strains cultivated in the absence of oil contained potential antioxidants.