

УДК 579.2:579.26:579.6

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА АДГЕЗИВНУЮ АКТИВНОСТЬ РОДОКОККОВ В ОТНОШЕНИИ Н-ГЕКСАДЕКАНА

© 2012 г. Е. В. Рубцова*, М. С. Куюкина*, **, И. Б. Ившина*, **

* Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, 614990

** Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, 614081, kuyukina@iegm.ru

Поступила в редакцию 18.01.2012 г.

Исследовано влияние условий роста (состав, кислотность, соленость питательной среды, температура и гидродинамический режим культивирования) на адгезию актинобактерий рода *Rhodococcus* к н-гексадекану. Проведенные исследования показали, что адгезивная активность родококков зависит от состава питательной среды и температуры их культивирования. Обсуждены возможные механизмы влияния ростовых условий на адгезию родококков к жидким углеводородам посредством изменения содержания клеточных липидов и зета-потенциала клеток. В результате исследования отобраны штаммы родококков, обладающие высокой (80–90%) адгезивной активностью при пониженной температуре (18°C), высокой солености (5.0% NaCl) и кислотности (рН 6.0) питательной среды, которые могут быть перспективны для использования в биотехнологиях очистки загрязненных углеводородами почв и вод.

Известно, что в решении одной из наиболее актуальных проблем современности – загрязнение окружающей среды нефтяными углеводородами, ключевую роль играют углеводородокисляющие микроорганизмы. Поэтому микробиологические методы деструкции углеводородных соединений рассматриваются в настоящее время, как наиболее перспективные способы очистки нефтезагрязненных экосистем. В естественных условиях процессы биodeградации углеводородов часто осложняются влиянием неблагоприятных факторов, таких, как пониженная температура, высокая минерализация, экстремальные значения кислотности среды и т.д. Следует отметить, что начальным этапом процесса биотрансформации любого гидрофобного соединения является бактериальная адгезия, интенсивность которой в значительной мере зависит от физико-химических параметров среды [1]. В связи с этим исследование адгезивных свойств углеводородокисляющих бактерий, обладающих устойчивостью к различным экологическим факторам, представляется актуальным для развития биотехнологий очистки загрязненных нефтяными углеводородами почв и вод.

Адгезивная активность микроорганизмов определяется свойствами клеточной поверхности, прежде всего степенью ее гидрофобности [2], на которую значительное влияние оказывают условия культивирования. В зарубежной литературе встречаются исследования адгезивной активности представителей родов *Bifidobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia* [3–5]. Однако особенности адгезии актинобактерий рода *Rhodococcus*, активно разрабатываемых биотехнологических агентов

окислительной трансформации природных и антропогенных углеводородов, практически не изучены [6, 7]. Нами ранее [8] показана высокая адгезивная активность родококков разных видов в отношении жидких н-алканов с длиной цепи от 6 до 16 атомов углерода. При этом наибольшие показатели адгезии к исследуемым углеводородам наблюдались у представителей *R. ruber*, адгезивная активность которых увеличивалась с возрастанием числа углеродных атомов в молекуле н-алкана.

Цель работы – изучение влияния условий роста (состав, кислотность, соленость питательной среды, температура и гидродинамический режим культивирования) родококков на их адгезивную активность в отношении н-гексадекана.

МЕТОДИКА

Объект исследования и условия культивирования. Использовали культуры актинобактерий рода *Rhodococcus*, принадлежащих к видам *R. erythropolis* (10 штаммов), *R. fascians* (11 штаммов), *R. longus* (5 штаммов), *R. opacus* (6 штаммов), *R. rhodochrous* (4 штамма), *R. ruber* (6 штаммов) и поддерживаемых в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН (акроним ИЭГМ; WFCC #768; www.iegm.ru/iegmcol/index.html), а также 30 мутантных клонов *R. ruber* ИЭГМ 231, полученных методом неспецифического in vitro Tn5 мутагенеза.

Для оценки влияния условий культивирования на адгезивную активность родококки параллельно выращивали на мясо-пептонном агаре

(МПА) и агаризованной минеральной среде К [9] следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1.0, K_2HPO_4 – 1.0, NaCl – 1.0, KNO_3 – 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2, $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.02, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.02. Дополнительно в минеральную среду вносили раствор микроэлементов (1.0 мл/л) [10]; дрожжевой экстракт (“Микроген”, Россия) (0.05 г/л), а также один из *n*-алканов: *n*-гексан, *n*-гептан, *n*-нонан, *n*-декан, *n*-ундекан, *n*-додекан, *n*-тетрадекан, *n*-гексадекан (98%, ООО “Вектон”, Санкт-Петербург) (1.0 об. %) либо глюкозу (10 г/л) в качестве источника углеродного питания. Культивирование осуществляли при 18, 28, 37°C на качалке (160 об/мин) либо стационарно в течение 3–7 сут. Также клетки выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ) с добавлением различных (1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 10, 15 и 20%) концентраций хлорида натрия, в диапазоне pH от 4.0 до 9.0 на качалке (160 об/мин) при 28°C.

Tn5-мутagenез клеток родококков. Использовали транспозому EZ::TNTM (KAN-2) Tnp TransposomeTM (“Epicentre Technologies”, США), представляющую собой комплекс транспозона Tn5 с встроенным геном устойчивости к канамицину и белка транспозазы. Процедуру трансформации проводили с помощью электропоратора *E. coli* PulserTM Transformation Apparatus (“Bio-Rad”, США) при напряжении 2.5 кВ и емкости 10 мкФ. Частоту трансформации вычисляли по количеству выросших на чашках с LB агаром (концентрация антибиотика в среде 100 мкг/мл) устойчивых к канамицину колоний по отношению к исходному числу клеток. Возможность спонтанных мутаций оценивали путем посева клеток исходной бактериальной культуры, не подвергнутой трансформации, на чашки с агаром LB, содержащим канамицин [11].

Присутствие транспозона Tn5 в бактериальной ДНК подтверждали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров KAN-2 FP-1 (5'-АЦЦТАЦААЦАААГЦТЦТЦАТЦААЦЦ-3') и KAN-2 RP-1 (5'-ГЦААТГТААЦАТЦАГАТАТТТТАГ-3') (“Epicentre Technologies”, США). ДНК из бактериальных клеток выделяли с помощью InstaGeneTM Matrix (“Bio-Rad”, США), согласно протоколу компании-производителя. Амплификацию проводили в термоциклере MyCycler (“Bio-Rad”, США). В качестве положительного контроля использовали транспозон EZ::TNTM (KAN-2).

Устойчивость мутантов к канамицину оценивали дискдиффузионным методом по величине диаметра отсутствия роста вокруг индикаторных дисков (“НИЦФ”, Санкт-Петербург), содержащих 30 мкг канамицина. Мутантные клоны хранили в среде LB с 10% глицерина и 100 мкг/мл канамицина при –84°C.

Определение степени адгезии клеток родококков к *n*-гексадекану. Адгезивную активность родо-

кокков к *n*-алканам (*n*-гексан, *n*-гептан, *n*-нонан, *n*-декан, *n*-ундекан, *n*-додекан, *n*-тетрадекан, *n*-гексадекан) (98%, ООО “Вектон”, Санкт-Петербург) определяли с помощью МАТН-теста (Microbial Adhesion to Hydrocarbons – Микробная адгезия к углеводородам) по модифицированной методике, приведенной нами ранее [12]. Модификация метода заключалась в экспериментальном подобранном соотношении гидрофобной–водной фаз, равном 1 : 2.5, при котором наблюдались устойчивые показатели клеточной адгезии к гидрофобному субстрату.

Для определения влияния температурных условий проведения МАТН-теста на адгезивную активность родококков к *n*-гексадекану показатели адгезии определяли при 18, 28 и 37°C.

Определение степени гидрофобности клеток родококков. Использовали метод солевой агрегации [13], для этого готовили различные (от 0.2 до 4 М с интервалом 0.2 М) концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в 0.001 М натрий-фосфатном буфере. На предметном стекле смешивали в равных количествах раствор сульфата аммония и суспензию клеток (10^7 кл./мл) в физиологическом растворе. Наблюдение процесса образования клеточных агрегатов проводили через 1 мин с использованием фазово-контрастной микроскопии (Axiostar Plus, “Karl Zeiss”, Германия) с масляно-иммерсионным объективом (ув. $\times 1000$). Минимальную концентрацию раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, при которой наблюдалось образование клеточных агрегатов, принимали за условное значение степени гидрофобности клеток. Согласно данному методу, чем более гидрофобна клеточная стенка бактерий, тем при меньшей концентрации раствора сульфата аммония наблюдается агрегация клеток [14]. Исходную клеточную суспензию без добавления $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ использовали в качестве контроля. Фотодокументирование полученных изображений осуществляли с помощью фотокамеры “Pixer” (США) и компьютерной программы “Видео-Тест – Размер 5.0” (Санкт-Петербург).

Определение суммарных клеточных липидов. Суммарные клеточные липиды экстрагировали по методике [15], согласно которой 0.05 г сухой биомассы суспендировали в 1 мл дистиллированной воды с последующим добавлением 4 мл смеси хлороформ–метанол (1 : 2). Полученную смесь встряхивали и оставляли на 1 сут, центрифугировали при 2000 g в течение 10 мин, надосадочную жидкость сливали в центрифужную пробирку, к осадку добавляли 5 мл смеси хлороформ–метанол–вода (1 : 2 : 0.8), встряхивали и центрифугировали. Супернатант объединяли с ранее полученным экстрактом и добавляли 5 мл смеси хлороформ–вода (1 : 1), повторно центрифугировали. Хлороформный слой переносили в предварительно взвешенную круглодонную колбу и упаривали на ротор-

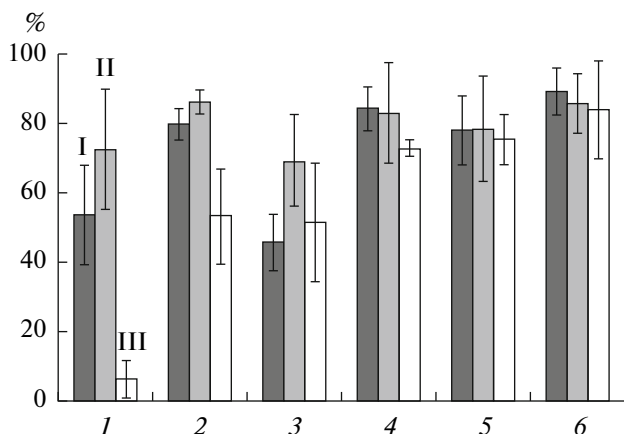


Рис. 1. Адгезивная активность (%) в отношении н-гексадекана клеток родококков, выращенных на разных средах: I – МПА; II – минеральная среда в присутствии н-гексадекана; III – в присутствии глюкозы. Приведены средние данные для родококков разных видов. 1 – *R. erythropolis* (4), 2 – *R. fascians* (4), 3 – *R. longus* (3), 4 – *R. opacus* (3), 5 – *R. rhodochrous* (4), 6 – *R. ruber* (5). В скобках указано число исследованных штаммов.

ном испарителе при 60°C, после чего колбу взвешивали до достижения постоянной массы на высокоточных аналитических весах AUW 120D (“Shimadzu”, Япония). Количество общих липидов выражали в процентах от сухой массы клеток. Эксперименты проводили в пятикратной повторности.

Определение зета-потенциала клеток родококков. Клетки *R. ruber* ИЭГМ 231, выращенные в МПБ, при различной температуре (18, 28 и 37°C), pH (от 6.0 до 8.0) и солёности (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0% NaCl) дважды отмывали и ресуспендировали в 10 mM KNO₃ (pH 7.0) до достижения значения оптической плотности (ОП_{600нм}) 0.2 (спектрофотометр Lambda EZ 201, “Perkin Elmer”, США). Зета-потенциал родококков в суспензиях регистрировали методом динамического светорассеяния на анализаторе ZetaSizer Nano ZS (“Malvern Instruments”, Великобритания) при 25°C. Автоматическую обработку полученных данных проводили с использованием программного обеспечения Malvern Zetasizer, v. 2.2 (“Malvern Instruments”, Великобритания). Эксперименты проводили в трехкратной повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние состава среды культивирования на адгезивную активность родококков. Результаты определения адгезивной активности клеток родококков к н-гексадекану в зависимости от состава среды их культивирования (рис. 1) свидетельствуют, что представители *R. opacus*, *R. rhodochrous* и *R. ruber* проявляют высокую (75–90%) адгезив-

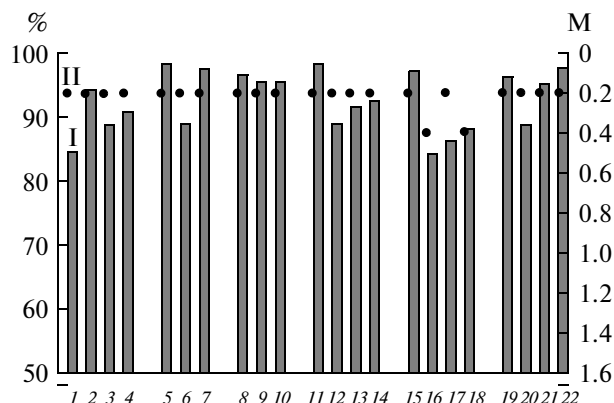


Рис. 2. Сравнительный анализ адгезивной активности и гидрофобности клеток родококков: I – результаты МАН-теста (% адгезии), II – результаты метода солевой агрегации (M (NH₄)₂SO₄). 1 – *R. erythropolis* ИЭГМ 24, 2 – *R. erythropolis* ИЭГМ 186, 3 – *R. erythropolis* ИЭГМ 268, 4 – *R. erythropolis* ИЭГМ 271, 5 – *R. fascians* ИЭГМ 35, 6 – *R. fascians* ИЭГМ 278, 7 – *R. fascians* ИЭГМ 170, 8 – *R. longus* ИЭГМ 27, 9 – *R. longus* ИЭГМ 28, 10 – *R. longus* ИЭГМ 29, 11 – *R. opacus* ИЭГМ 37, 12 – *R. opacus* ИЭГМ 62, 13 – *R. opacus* ИЭГМ 716, 14 – *R. opacus* ИЭГМ 458, 15 – *R. rhodochrous* ИЭГМ 64, 16 – *R. rhodochrous* ИЭГМ 632, 17 – *R. rhodochrous* ИЭГМ 633, 18 – *R. rhodochrous* ИЭГМ 646, 19 – *R. ruber* ИЭГМ 231, 20 – *R. ruber* ИЭГМ 235, 21 – *R. ruber* ИЭГМ 219, 22 – *R. ruber* ИЭГМ 326.

ную активность при культивировании как в присутствии углеводорода, так и без него. Это указывает на повышенную гидрофобность клеточной стенки родококков данных видов независимо от состава ростовой среды, что, по-видимому, обуславливает их врожденную адаптацию к усвоению углеводородных субстратов [16]. Как видно из рис. 1, для представителей видов *R. erythropolis*, *R. fascians* и *R. longus* среда культивирования оказывала дифференцированное влияние на адгезивную активность: средние показатели клеточной адгезии при использовании глюкозы в качестве источника углерода не превышали 55%, тогда как культивирование в присутствии н-гексадекана способствовало значительному (до 30%) повышению адгезивной активности по сравнению с культурами, выращенными на МПА. По-видимому, присутствие углеводорода в среде культивирования способствует повышению степени гидрофобности клеточной поверхности у представителей данных видов родококков и, как следствие, увеличению адгезивной активности в отношении н-гексадекана. Данные о гидрофобности бактериальных клеток, полученные с использованием метода солевой агрегации, свидетельствовали (рис. 2), что большинство исследуемых культур родококков характеризуются высокой гидрофобностью клеточной поверхности (0.2 M (NH₄)₂SO₄). На микрофотографиях (рис. 3) пред-

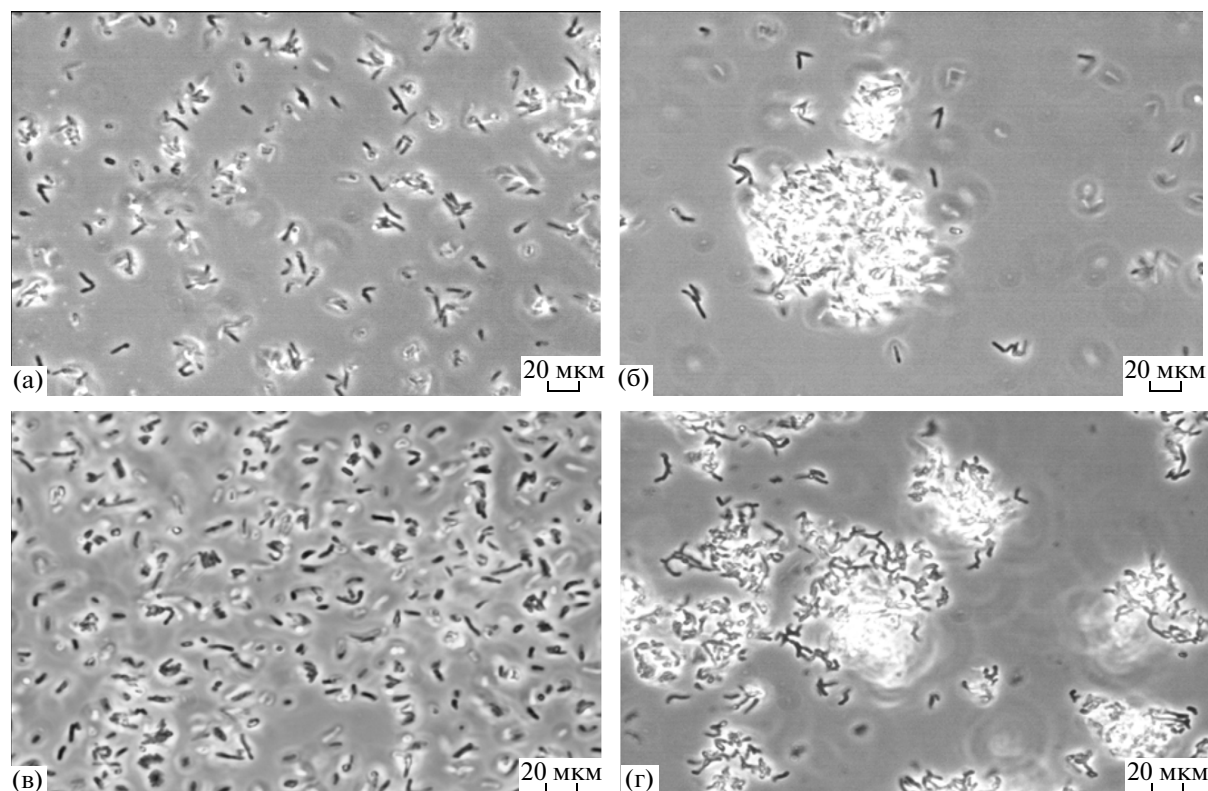


Рис. 3. Микрофотографии клеточных агрегатов родококков, формируемых в растворах сульфата аммония: *R. fascians* ИЭГМ 34 (а – контроль; б – в присутствии 0.2 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), *R. erythropolis* ИЭГМ 271 (в – контроль; г – 0.2 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

ставлены примеры коагрегации клеток родококков под действием раствора сульфата аммония.

С целью более детального исследования влияния природы гидрофобного источника углеродного питания на адгезивную активность клетки родококков выращивали в присутствии *n*-алканов с длиной цепи от 6 до 16 атомов углерода. Нами установлена четкая зависимость ($R = 0.87$, $p = 0.0049$) между интенсивностью клеточного роста в присутствии данных углеводов и степенью адгезии к ним клеток родококков (рис. 4). Полученные данные свидетельствуют о том, что интенсивность роста родококков в присутствии различных алифатических углеводов обу-

словлена эффективностью процесса их адгезии к исследованным гидрофобным соединениям.

Эффективным способом изучения генетических основ функциональных характеристик бактериальных клеток является получение мутантов. Результаты исследования адгезивной активности Тn5-мутантных клонов родококков показали (табл. 1), что полученные мутанты характеризуются пониженной степенью адгезии к *n*-гексадекану по сравнению с родительским штаммом *R. ruber* ИЭГМ 231, а также более низкими показателями накопления клеточной биомассы.

Известно, что степень гидрофобности микробных клеток определяется содержанием клеточных липидов [17]. Проведенные нами сравни-

Таблица 1. Адгезивная активность и показатели роста Тn5 мутантных клонов *R. ruber* ИЭГМ 231 в присутствии *n*-гексадекана

Исследуемые мутантные клоны	Степень адгезии, %	Клеточная биомасса, г/л
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 231 (исходный штамм)	96.6 ± 2.4	4.4 ± 0.1
2, 3, 4, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 30, 35, 42, 46, 49, 50, 119, 137	80 ± 4.3 – 97 ± 2.5	2.6 ± 0.05 – 4.1 ± 0.63
7, 25, 31, 58, 66, 87, 110	60 ± 3.1 – 79 ± 4.2	1.4 ± 0.52 – 2.5 ± 0.46
61	0	0

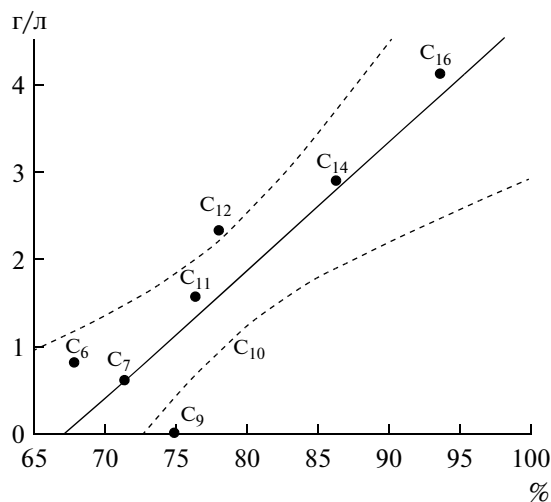


Рис. 4. Зависимость показателя клеточной биомассы родококков (г/л) от их адгезивной активности (%) в отношении алифатических углеводородов (н-гексан, C_6 ; н-гептан, C_7 ; н-нонан, C_9 ; н-декан, C_{10} ; н-ундекан, C_{11} ; н-додекан, C_{12} ; н-тетрадекан, C_{14} ; н-гексадекан, C_{16}). Представлены средние данные для *R. ruber* ИЭГМ 219, ИЭГМ 231, ИЭГМ 326.

тельные исследования количества липидов при росте на разных средах (рис. 5) показали увеличение данного компонента в клетках родококков при росте на минеральной среде с добавлением н-гексадекана (17–22%) по сравнению с таковыми, растущими в МПБ (8–14%). Кроме того, ранее нами было показано [17], что в составе клеточных липидов родококков, выращенных в присутствии н-гексадекана, содержание предельных (насыщенных) жирных кислот и нейтральных фосфолипидов (в частности, кардиолипина и фосфатидилэтаноламина) выше, чем в клетках, растущих в МПБ. Это, по-видимому, обуславливает повышение степени клеточной адгезии к неполярному углеводороду. Следует отметить, что полученный мутант 61 (см. табл. 1), дефицитный по адгезии и неспособный к росту на н-гексадекане, характеризуется наиболее гидрофильной клеточной стенкой (количество суммарных липидов

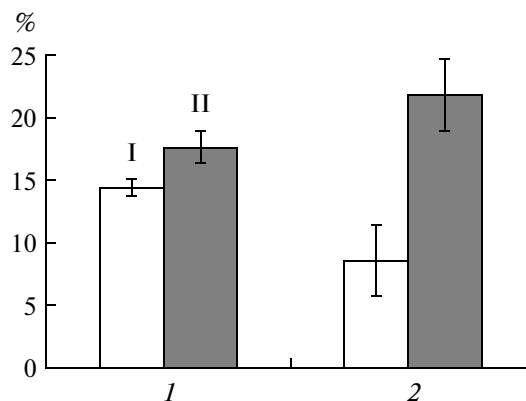


Рис. 5. Содержание липидов (%) в клетках родококков, выращенных в МПБ (I) и агаризованной среде “К” в присутствии паров н-гексадекана (II). Бактериальные штаммы: 1 – *R. ruber* ИЭГМ 371, 2 – *R. ruber* ИЭГМ 324.

клеток составляет $5.4 \pm 0.76\%$ от сухой массы клеток, что в 2 раза меньше по сравнению с таковым родительского штамма).

При исследовании влияния показателя кислотности среды на адгезивную активность 23 штаммов родококков было показано, что 90% исследуемых культур не способны расти в кислой (pH 5.0) питательной среде. Благоприятные условия для роста подавляющего большинства культур ограничены диапазоном pH 6.0–8.0, за исключением представителей *R. ruber*, способных расти и в щелочных (pH 9.0) условиях. При этом наиболее высокие (70–100%) показатели адгезии наблюдались при культивировании родококков в нейтральной и слабощелочной среде (pH 7.0–8.0) (табл. 2). Выявлено 2 штамма родококков (*R. rhodochrous* ИЭГМ 66, *R. ruber* ИЭГМ 231), способных расти в условиях кислой (pH 5.0) среды, однако при этом их адгезивная активность в отношении н-гексадекана не превышала 50%.

Влияние солености питательной среды на адгезию родококков к н-гексадекану оказалось неоднозначным (табл. 3). Наиболее высокие (75–

Таблица 2. Влияние показателя кислотности среды культивирования родококков на их адгезивную активность в отношении н-гексадекана*

Бактериальный вид	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0
<i>R. erythropolis</i> (5)	43 ± 11	61 ± 12	57 ± 14	–
<i>R. fascians</i> (4)	61 ± 8	74 ± 10	75 ± 6	–
<i>R. longus</i> (4)	48 ± 9	51 ± 11	42 ± 14	–
<i>R. opacus</i> (4)	75 ± 9	88 ± 7	68 ± 7	–
<i>R. rhodochrous</i> (7)	88 ± 9	89 ± 4	91 ± 4	–
<i>R. ruber</i> (6)	85 ± 6	84 ± 6	73 ± 5	58 ± 9

*Представлены средние для вида значения адгезии. В скобках указано количество штаммов. Прочерк означает отсутствие роста.

Таблица 3. Адгезивная активность родококков разных видов в зависимости от концентрации NaCl в среде культивирования*

Бактериальный вид	Концентрация NaCl в среде культивирования, %					
	0.5	1	2	3	4	5
<i>R. erythropolis</i> (7)	51 ± 7	55 ± 11	46 ± 7	53 ± 6	46 ± 11	51 ± 12
<i>R. fascians</i> (5)	88 ± 5	79 ± 9	78 ± 8	75 ± 9	0	–
<i>R. longus</i> (4)	70 ± 8	50 ± 12	41 ± 13	31 ± 14	0	0
<i>R. opacus</i> (4)	86 ± 4	77 ± 8	46 ± 12	62 ± 8	58 ± 10	–
<i>R. rhodochrous</i> (8)	73 ± 9	70 ± 12	70 ± 11	73 ± 11	74 ± 9	60 ± 9
<i>R. ruber</i> (10)	90 ± 4	79 ± 8	76 ± 9	72 ± 9	70 ± 10	39 ± 14

* В скобках указано количество штаммов. Представлены средние для вида данные адгезивной активности по результатам МАТН-теста. Прочерк означает отсутствие роста.

95%) показатели адгезии были зафиксированы при низких (0.5–1.0%) концентрациях NaCl. Установлено, что содержание хлорида натрия в среде свыше 4.0% не способствует росту родококков за исключением отдельных представителей *R. erythropolis*, *R. rhodochrous* и *R. ruber*.

Для большинства штаммов родококков наблюдалась общая тенденция понижения адгезивной активности с увеличением концентрации NaCl в среде культивирования, что согласуется с данными [18] для умеренно-галофильной бактерии *Halomonas elongata*, которые авторы объясняли адаптационным механизмом к условиям высокой солености среды, реализуемым в снижении степени гидрофобности клеточной стенки с целью увеличения сродства клеток к молекулам воды в концентрированном водно-солевом растворе. Однако в то же время нами выявлены штаммы *R. opacus* ИЭГМ 262, *R. rhodochrous* ИЭГМ 608, ИЭГМ 639, для которых концентрация хлорида натрия в среде более 2.0% оказывала стимулирующий эффект на их адгезивную активность. Кроме того, у единичных штаммов (*R. rhodochrous* ИЭГМ 63, ИЭГМ 64, ИЭГМ 67, *R. ruber* ИЭГМ 73, ИЭГМ 219, ИЭГМ 326, ИЭГМ 328) наблюдались стабильные показатели адгезии к углеводороду при повышении концентрации NaCl в среде от 0.5 до 5.0%. Следует отметить, что умеренная галотолерантность, свойственная данным видам родококков [19], дает им определенные экологические преимущества по сравнению с другими

представителями углеводородокисляющей микрофлоры, в частности в биотопах наземных и морских экосистем, подвергнутых нефтяному загрязнению.

Влияние температурных условий культивирования на адгезивную активность родококков. По нашим данным, температура культивирования оказывала дифференцированное влияние на адгезивную активность родококков (рис. 6). При выращивании клеток в МПБ или на МПА (рис. 6а, б) для большинства исследованных штаммов наблюдались стабильные показатели адгезии независимо от температурного режима культивирования. Однако при выращивании родококков на минеральной среде с добавлением н-гексадекана (рис. 6в) понижение или повышение температуры культивирования до 18 и 37°C соответственно, значительно снижали адгезивную активность клеток, которая в среднем не превышала 65%. Так, показатели адгезии подавляющего большинства представителей видов *R. fascians*, *R. opacus*, *R. rhodochrous* и *R. ruber*, выращенных на минеральной среде при 28°C, значительно (на 35–55%) превышали таковые родококков, культивируемых при 37°C.

Таким образом, оптимальная температура культивирования представителей рода *Rhodococcus* и достижения максимальной эффективности их клеточной адгезии к жидким углеводородам составляет 28°C. Вместе с тем нами были отобраны еди-

ничные штаммы (*R. rhodochrous* ИЭГМ 64, ИЭГМ 608, *R. opacus* ИЭГМ 246, *R. ruber* ИЭГМ 328), адгезивная активность которых возрастала на 25–30% при снижении температуры культивирования до 18°C. Данные культуры могут быть использованы в процессах биоремедиации нефтезагрязненных экосистем в холодных климатических условиях [20, 21].

Следует отметить, что минеральная среда с добавлением *n*-гексадекана оказалась наименее благоприятной средой культивирования родококков при пониженной (18°C) температуре. При этом в отдельных случаях (штаммы *R. longus* ИЭГМ 68 и *R. opacus* ИЭГМ 56) гексадеканосодержащая среда не поддерживала бактериального роста, что, очевидно, связано с низкой биодоступностью данного субстрата при низких температурах вследствие увеличения его вязкости (температура замерзания *n*-гексадекана 16°C).

Для определения вклада электростатической компоненты в процессы адгезии родококков к углеводороду определяли зета-потенциал клеток *R. ruber* ИЭГМ 231, выращенных при различных температурах, pH и солёности среды культивирования. По нашим данным, температура и pH среды культивирования оказывали одинаковое влияние как на адгезию родококков, так и на значение их зета-потенциала (рис. 7а, б), однако при изменении солёности среды аналогичной зависимости не наблюдалось (рис. 7в). При этом оказалось, что наиболее высоким значениям зета-потенциала (–22 ... –26 мВ) соответствуют максимальные (95–98%) показатели адгезивной активности клеток. Известно, что *n*-гексадекан в водной среде обладает отрицательным зарядом [22], следовательно, чем выше зета-потенциал бактериальных клеток, тем в меньшей степени происходит их отталкивание от поверхности углеводорода, а показатели адгезии выше.

Влияние гидродинамических условий культивирования на адгезивную активность родококков.

При исследовании влияния гидродинамического режима культивирования родококков было установлено, что выращивание клеток на орбитальной качалке (160 об/мин) способствует 5–20% повышению их адгезивной активности в отношении *n*-гексадекана. Однако нами установлено для единичных штаммов (*R. longus* ИЭГМ 68, *R. rhodochrous* ИЭГМ 608, ИЭГМ 647 в частности), что рост в стационарных условиях способствует 25–40% увеличению степени их адгезии к углеводороду. Представители видов *R. opacus*, *R. rhodochrous* и *R. ruber* характеризуются высокими (60–85%) показателями адгезивной активности независимо от гидродинамических условий.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что изменение температуры и pH среды культивирования оказывает влия-

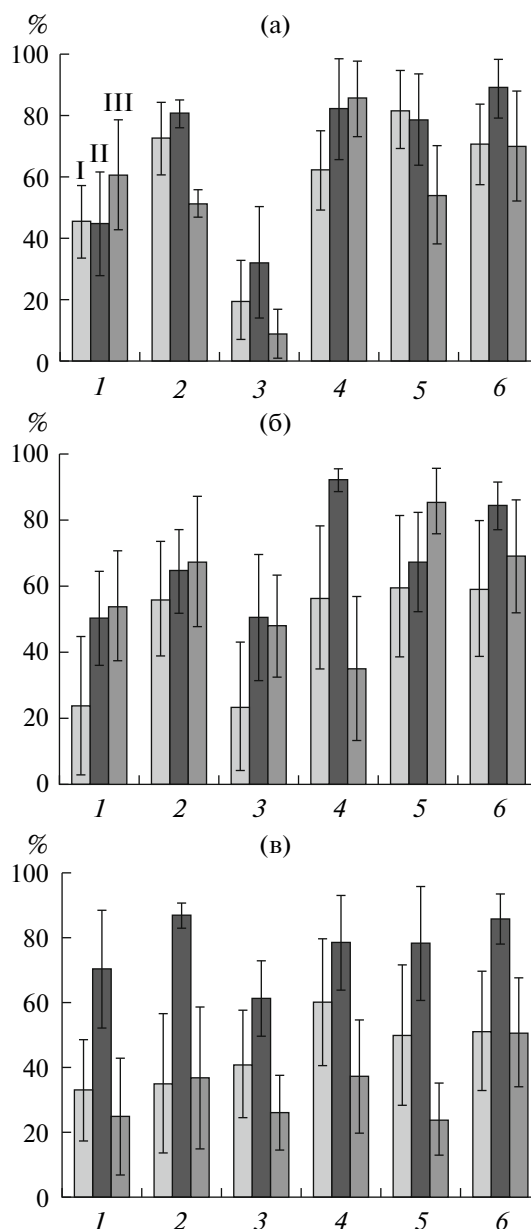


Рис. 6. Адгезивная активность (%) родококков, выращенных в МПБ (а), МПА (б) и агаризованной среде “К” в присутствии паров *n*-гексадекана (в), при различных температурах: I – 18°C, II – 28°C, III – 37°C. Бактериальные виды: 1 – *R. erythropolis* (4), 2 – *R. fascians* (4), 3 – *R. longus* (3), 4 – *R. opacus* (3), 5 – *R. rhodochrous* (4), 6 – *R. ruber* (5). В скобках указано число исследованных штаммов.

ние на гидрофобные и электростатические свойства клеток родококков, которые, по-видимому, принимают участие в процессах адгезии к жидким углеводородам [22]. Показано, что наиболее высокая адгезивная активность клеток родококков к *n*-гексадекану проявляется при их культивировании в углеводородсодержащей среде, а также в нейтральной или слабощелочной (pH 7.0–8.0)

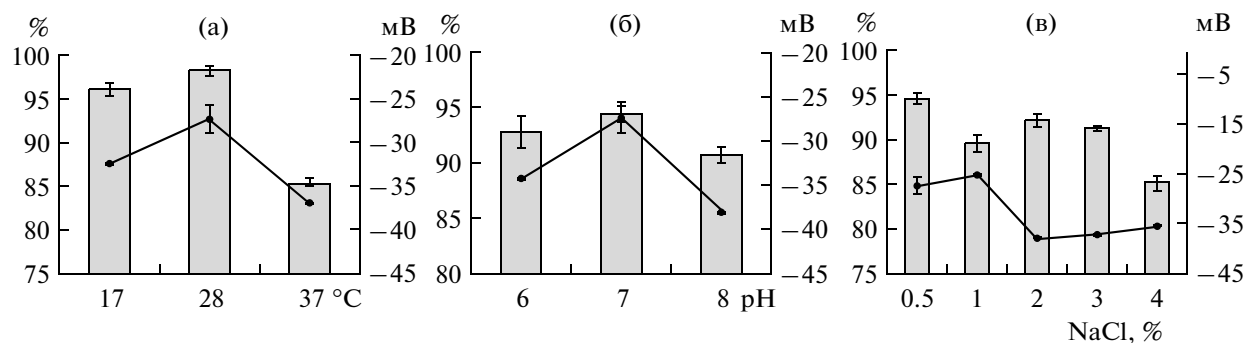


Рис. 7. Адгезивная активность (%) и зета-потенциал (мВ) клеток *R. ruber*, выращенных при различных температурах (а), рН (б) и солёности (в) среды культивирования.

среде при 28°C в присутствии 0.5–1.0% NaCl. В результате исследования отобраны штаммы, обладающие высокой адгезивной активностью при пониженной температуре, повышенной солёности (кислотности) питательной среды и толерантные к условиям культивирования. Данные представители рода *Rhodococcus* могут быть рекомендованы для использования в процессах биотрансформации углеводородных соединений, а также в составе биопрепаратов, предназначенных для биоремедиации нефтезагрязнённых наземных и морских экосистем в холодных климатических условиях.

Исследование выполнено при поддержке грантов Президента РФ “Ведущие научные школы”, Министерства образования и науки РФ (16.518.11.7069; 16.513.12.3015) и Программы Президиума РАН “МКБ”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Katsikogianni M., Missirlis Y.F. // Eur. Cell Mater. 2004. V. 8. P. 37–57.
- Bos R., van der Mei H.C., Busscher H.J. // FEMS Microbiol. Rev. 1999. V. 23. № 2. P. 179–230.
- Mikucka A., Gospodarek E., Ulatowska B. // Med. Dosw. Mikrobiol. 2000. V. 52. № 1. P. 9–15.
- Norman R.S., Frontera-Suau R., Morris P.J. // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. № 10. P. 5096–5103.
- Ram C., Chander H. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 19. № 4. P. 407–410.
- Ivshina I. // WFCC Newsletter. 2001. № 33. P. 8–14.
- Martínková L., Uhnáková B., Pátek M., Nešvera J., Křen V. // Environ. Int. 2009. V. 35. № 1. P. 162–177.
- Куюкина М.С., Ившина И.Б., Рубцова Е.В., Иванов Р.В., Лозинский В.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 2. С. 176–182.
- Каталог штаммов региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов / Ред. И.Б. Ившина. М.: Наука, 1994. 163 с.
- Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных вод. Лабораторное руководство. М.: Наука, 1974. 194 с.
- Fernandes P.J., Powell J.A., Archer A.C. // Microbiology. 2001. V. 147. № 9. P. 2529–2536.
- Kuyukina M.S., Rubtsova E.V., Ivshina I.B., Ivanov R.V., Lozinsky V.I. // J. Microbiol. Methods. 2009. V. 79. № 1. P. 76–81.
- Krepesky N., Ferreira R.B.R., Nunes A.P.F., Lins U.G.C., Filho F.C.S., de Mattos-Guaraldi A.L., Nettos Santos K.R. // Current Microbiol. 2003. V. 46. № 4. P. 280–286.
- Sorongon M.L., Bloodgood R.A., Burchard R.P. // Appl. Environ. Microbiol. 1991. V. 57. № 11. P. 3193–3199.
- Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир, 1975. 324 с.
- Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen C.C.R. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology / Ed. K.N. Timmis. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 2010. P. 1840–1852.
- Куюкина М.С., Ившина И.Б., Рычкова М.И., Чумаков О.Б. // Микробиология. 2000. Т. 69. № 1. С. 62–69.
- Hart D.J., Vreeland R.H. // J. Bacteriol. 1988. V. 170. № 1. P. 135–135.
- Плотникова Е.Г., Рыбкина Д.О., Ананьина Л.Н., Ястребова О.В., Демаков В.А. // Экология. 2006. № 4. С. 261–268.
- Ившина И.Б., Куюкина М.С., Костарев С.М. // Нефтяное хозяйство. 2003. № 9. С. 116–119.
- Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Biology of *Rhodococcus* / Ed. H.M. Alvarez. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 2010. P. 291–313.
- Geertsema-Doornbusch G.I., van der Mei H.C., Busscher H.J. // J. Microbiol. Methods. 1993. V. 18. № 1. P. 61–68.

Effect of Cultivation Conditions on the Adhesive Activity of Rhodococci towards n-Hexadecane

E. V. Rubtsova^a, M. S. Kuyukina^{a, b}, and I. B. Ivshina^{a, b}

^a Perm State National Research University, Perm, 614990 Russia

^b Institute of Microorganism Ecology and Genetics, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia

e-mail: kuyukina@iegm.ru

Received January 18, 2012

Abstract—The effect of cultivation conditions (the composition, acidity, and salinity of the cultivation medium; temperature; and the hydrodynamic conditions of cultivation) on the adhesion of actinobacteria of the genus *Rhodococcus* to n-hexadecane has been investigated. A study performed showed that the adhesive activity of rhodococci depends on the composition of the cultivation medium and on the cultivation temperature. The possible mechanisms underlying the effect of growth conditions on the adhesion of rhodococci to liquid hydrocarbons and involving changes in the cell lipid content or the zeta potential of cells are addressed. Rhodococcal strains displaying high adhesive activity (80–90%) at a low temperature (18°C), high salinity (5.0% NaCl), and acidity (pH 6.0) of the cultivation medium have been selected as a result of the present work; these strains have a considerable potential for use in bioremediation of soil and water contaminated by hydrocarbons.