

УДК 57.083.133

КАТАЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ

© 2012 г. О. А. Гоголева, Н. В. Немцева, О. В. Бухарин

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН,

г. Оренбург, 460000, olik-g@yandex.ru, ikvs@mail.esoo.ru

Поступила в редакцию 21.11.2011 г.

Изучена динамика каталазной активности углеводородоокисляющих бактерий *Gordona terrae*, *Rhodococcus rubropertinctus* и *Rhodococcus erythropolis* в процессе деструкции нефтепродуктов. Экспериментально установлена прямая зависимость между снижением каталазной активности углеводородоокисляющих микроорганизмов и интенсивностью деструкции нефтепродуктов. Найденная зависимость позволяет рассматривать каталазную активность бактерий в качестве индикатора начального этапа окисления нефтепродуктов и может найти применение при выборе штаммов-деструкторов с целью создания биопрепаратов, пригодных для ремедиации природных экосистем.

Наиболее распространенными и опасными загрязнителями окружающей среды являются нефть и продукты ее переработки, которые, попадая в водную среду, подвергаются действию физических, химических и биологических факторов. Образующиеся при этом продукты окисления могут быть токсичнее исходного вещества. В результате угнетается жизнедеятельность гидробионтов, что отрицательно сказывается на структуре водных сообществ и экосистем [1, 2]. Поэтому исследование способов биодegradации углеводородов имеет большое экологическое значение.

Многие аэробные и анаэробные микроорганизмы, различающиеся набором ферментных систем, а также метаболическими путями потребления углеводородов, способны использовать нефть и нефтепродукты в качестве источника углерода и энергии. При этом скорость и полнота разрушения нефтяных углеводородов зависит от ряда факторов, в частности от температуры, pH среды, содержания кислорода в воде и т.п. [3]. Для аэробных микроорганизмов важнейшим фактором успешного окисления нефти и нефтепродуктов является достаточное содержание растворенного кислорода, необходимое для преобразования нефтяных фракций [4]. Образующиеся при этом пероксиды ускоряют процессы окисления. Одним из ферментов антиоксидантной защиты является каталаза [5], роль которой в процессе деструкции нефти недостаточно изучена.

Цель работы – оценка каталазной активности углеводородоокисляющих бактерий и ее динамики в процессе деструкции нефти и нефтепродуктов.

МЕТОДИКА

Были отобраны чистые культуры углеводородоокисляющих бактерий: *Gordona terrae* (Tsukamura 1971) Stackebrandt et al. 1989 ИКВС № 19, *Rhodococcus rubropertinctus* (Hefferan 1904) Tsukamura

1974 ИКВС № 15, *Rhodococcus erythropolis* (Grey and Thornton 1928) Goodfellow and Alderson 1979 ИКВС № 11, выделенные нами ранее из природной среды и содержащиеся в лабораторных условиях.

Для выращивания культур использовали модифицированную агаризированную среду Чапека [6]. Культуры выращивали в чашках Петри при 25–27°C, в течение 48 ч. Через 48 ч из выросших культур готовили взвесь по стандарту мутности БАК-5 (ГНИСК им. Л.А. Тарасевича).

Поллитровые флаконы заполняли средой Раймонда [6] в объеме 250 мл, в которые вносили микробную взвесь в количестве 1 см³ так, чтобы конечная концентрация бактерий составила 10⁶ кл./см³. В качестве единственного источника углерода в среду добавляли 1 см³ дизельного топлива, при этом конечная концентрация во флаконе составляла 610 мг/дм³. Эксперимент проводили в течение 35 сут, инкубацию осуществляли в термостатируемой комнате при 25–27°C в условиях естественного освещения.

В процессе эксперимента рост численности бактерий учитывали чашечным методом. Подсчет выросших на чашках колоний осуществляли в автоматическом режиме с помощью счетчика колоний ProtoCOL HR (“Synoptics Ltd”, Великобритания).

Содержание нефтепродуктов в опытных образцах определяли в аккредитованном испытательном центре Федерального государственного учреждения здравоохранения “Центр гигиены и эпидемиологии в Оренбургской области” с помощью флуориметрического метода на жидкостном анализаторе Флюорат – 02 (“Люмэкс”, Россия). Для этого 100 мл культуральной жидкости переносили в делительную воронку, отбирали 10 мл

гексана и ополаскивали им сосуд, в котором находилась проба, затем гексан помещали в делительную воронку. Смесь перемешивали 30 с, отстаивали до появления прозрачного верхнего слоя, который отделяли, помещали в кювету и измеряли концентрацию нефтепродуктов в экстракте. Водную фазу отбирали в цилиндр и точно фиксировали ее объем.

Концентрацию нефтепродукта рассчитывали по формуле:

$$X_{\text{пр}} = \frac{X_{\text{изм}} V_r K_1}{V_{\text{пр}}}$$

где $X_{\text{пр}}$ – концентрация нефтепродуктов в пробе воды, мг/мл; $X_{\text{изм}}$ – концентрация нефтепродуктов в растворе гексана, измеренная на приборе, мг/л; V_r – объем гексана, взятый для экстракции, мл; $V_{\text{пр}}$ – объем пробы, мл; K_1 – степень разбавления экстракта.

Содержание нефтепродуктов в исследуемом образце выражали в процентах от исходной концентрации.

Наличие и уровень каталазной активности углеводородоокисляющих бактерий определяли фотометрически по методике Бухарина О.В. с соавт. [7]. Для этого исследуемые штаммы высевали из опытных образцов на твердую питательную среду Чапека, не содержащую нефтепродукты. Посевы инкубировали в течение 3 сут при 25°C, затем из выросших колоний приготавливали взвесь с оптической плотностью 0.2 усл. ед. (при длине волны 492 нм). К 0.2 мл полученной взвеси исследуемого штамма добавляли 1 мл свежеприготовленного 0.0125 М раствора пероксида водорода и инкубировали 10 мин при комнатной температуре, реакцию разложения пероксида водорода каталазой останавливали добавлением 5 капель 2 н. раствора соляной кислоты. Затем добавляли 1 мл свежеприготовленного 0.025 М раствора йодида калия, тщательно перемешивали и осаждали клетки исследуемого штамма центрифугированием в течение 15 мин при 3000 g. Через 10 мин после центрифугирования измеряли поглощение света образовавшегося в надосадочной жидкости комплекса йод–йодид калия (при длине волны 492 нм в плоскодонном полистироловом 96-луночном планшете с ячейкой объемом 0.25 мл на фотометре “ИФА-ОЭП” (ТОО “Оптоэлектронные приборы”, Россия).

Расчет активности каталазы проводили по формуле:

$$A_{\text{кат}} = \frac{12.500(1 - \text{ОП}_0 / \text{ОП}_k)}{T \times \text{ОП}_m}$$

где $A_{\text{кат}}$ – активность каталазы, микромоль/мин · ОП; ОП_0 – оптическая плотность комплекса йод–йодид калия в опыте; ОП_k – оптическая плот-

ность комплекса йод–йодид калия в контроле, полученном путем смешивания исходных объемов растворов пероксида водорода, йодида калия и соляной кислоты; T – время инкубации исследуемой культуры с пероксидом водорода; ОП_m – оптическая плотность микробной взвеси, взятой для определения каталазной активности.

Каталазную активность исследуемой культуры бактерий выражали в процентах от исходного уровня.

Количество пероксидов, образующееся в процессе деструкции, регистрировали в опытных образцах по реакции окисления люминола (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион), сопровождающейся хемилюминесценцией в присутствии пероксида водорода и пероксидазы [8]. Для этого использовали культуральную среду, отобранную из опытных флаконов с исследуемыми штаммами и нефтепродуктами. Интенсивность хемилюминесценции измеряли на хемилюминомере ХЛ-003 (“УГАТУ”, Россия). В камеру прибора помещали кювету с раствором, содержащим 10 мл калий-фосфатного буфера (0.01 М $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 1 мМ KCl , рН 6.5), 2 мл раствора пероксидазы хрена (“Merck”, Германия, конечная активность 15 ед./мл), приготовленного на калий-фосфатном буфере, 2 мл люминола (“Merck”, Германия, 0.05 мг/мл), растворенного в дистиллированной воде, и 0.5 мл культуральной среды. Камеру закрывали и при непрерывном помешивании с равномерной скоростью в кювету вносили еще 0.5 мл культуральной среды. Наличие пероксида водорода оценивали по вспышке хемилюминесценции.

Данные, полученные в результате проведенных исследований, были подвергнуты статистической обработке [9] с помощью программы MS Excel 2007. Определялся коэффициент корреляции Пирсона, статистическая значимость коэффициента корреляции оценивалась с помощью критерия Стьюдента при уровне значимости $p = 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика численности микроорганизмов при деструкции дизельного топлива. В экспериментальных условиях при росте на минеральной среде с добавлением дизельного топлива наблюдали увеличение численности клеток исследуемых культур микроорганизмов, кривые роста которых представлены на рис. 1. Как видно из представленных данных, у штамма *G. terrae* отмечено увеличение численности клеток на два порядка в течение первых 6 сут культивирования. Начиная с 7 сут, наблюдали снижение численности бактерий. У *R. rubropertinctus* увеличение численности зарегистрировано на один порядок, максимальные значения отмечали на 6–12 сут. К 23 сут численность бактерий снижалась и продолжала па-

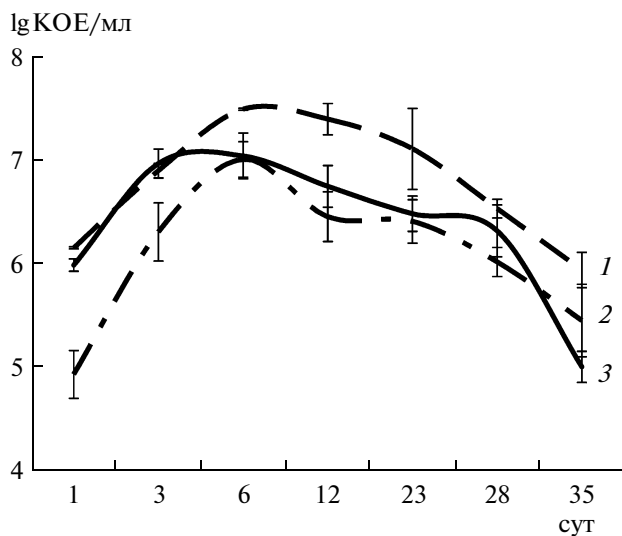


Рис. 1. Динамика численности микроорганизмов в процессе деструкции дизельного топлива 1 – *R. rubropertinctus* ИКВС № 15, 2 – *G. terrae* ИКВС № 19, 3 – *R. erythropolis* ИКВС № 11.

дать вплоть до конца эксперимента. У *R. erythropolis* увеличение численности на протяжении первых суток было незначительным и, к концу эксперимента, количество клеток у этого штамма было ниже исходного уровня.

Полученные данные свидетельствуют о разной интенсивности роста исследуемых культур на среде с дизельным топливом, что можно объяснить различной интенсивностью потребления нефтепродукта.

Потребление микроорганизмами дизельного топлива. В процессе исследования было проведено определение интенсивности потребления нефтепродукта исследуемыми культурами микроорганизмов. Первоначальная концентрация дизельного топлива составляла 610 ± 0.5 мг/л, что соответствовало 100% содержанию нефтепродукта в исходной среде. Максимальное потребление дизельного топлива отмечено у *G. terrae* – содержание нефтепродукта в среде к 6 сут составило $4.4 \pm 1.83\%$. У *R. rubropertinctus* потребление нефтепродукта нарастало постепенно и к 23 сут содержание дизельного топлива в среде составило $62 \pm 4.13\%$. По результатам химического анализа снижение концентрации дизельного топлива в питательной среде при росте *R. erythropolis* было сопоставимо с естественным испарением нефтепродукта, регистрируемым в контроле (рис. 2). Исходя из полученных данных, штамм *R. erythropolis* не использовал дизельное топливо в качестве источника углерода.

В результате проведенных исследований установлено, что максимум углеводородокисляющей активности штаммов приходился на 6–12 сут экс-

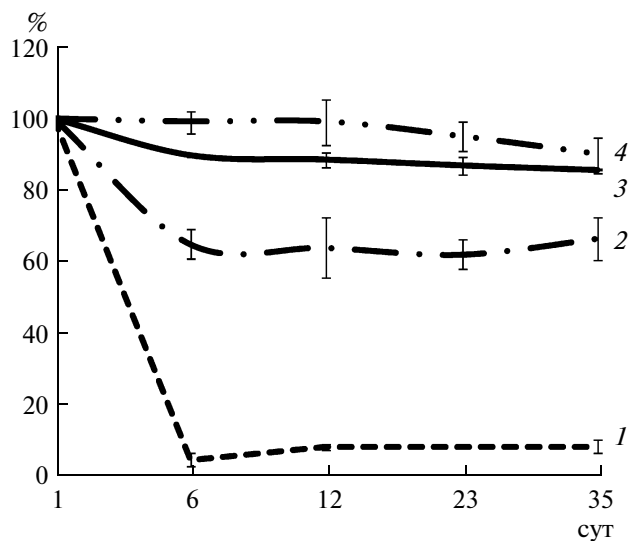


Рис. 2. Изменение количества дизельного топлива в процессе микробной деструкции 1 – *G. terrae* ИКВС № 19, 2 – *R. rubropertinctus* ИКВС № 15, 3 – *R. erythropolis* ИКВС № 11, 4 – контроль.

перимента. В этот же период отмечен рост численности клеток штаммов *G. terrae* и *R. rubropertinctus*.

Установлено, что в условиях использования дизельного топлива в качестве единственного источника углерода и энергии исследуемые микроорганизмы *G. terrae* и *R. rubropertinctus* способны к потреблению углеводов, в отличие от *R. erythropolis*.

Определение гидропероксидов в среде при деструкции дизельного топлива. Известно, что на начальном этапе деструкции происходит окисление субстрата молекулярным кислородом с участием ферментных систем, следствием этого процесса является образование пероксидов и гидропероксидов. Данные соединения выявляются в реакции окисления люминола, сопровождающейся хемолюминесценцией. При этом, как правило, наблюдается интенсивная хемилюминесценция, что свидетельствует о высокой концентрации образующихся гидропероксидов [10].

Исходя из данных, представленных на рис. 3, наиболее низкие значения интенсивности хемилюминесценции, по сравнению с контролем, наблюдали в опыте с *G. terrae*. Максимальная интенсивность хемилюминесценции в опыте с *G. terrae* была отмечена на 6 сут. К 12 сут кривая этих показателей резко снижалась и находилась на нулевой отметке вплоть до окончания эксперимента (35 сут). В опыте с *R. rubropertinctus* отмечена более интенсивная и продолжительная хемилюминесценция по сравнению с предыдущим штаммом. Максимальные значения регистрировали на 6 сут эксперимента, после чего интенсивность хемилюминесценции постепенно снижалась вплоть

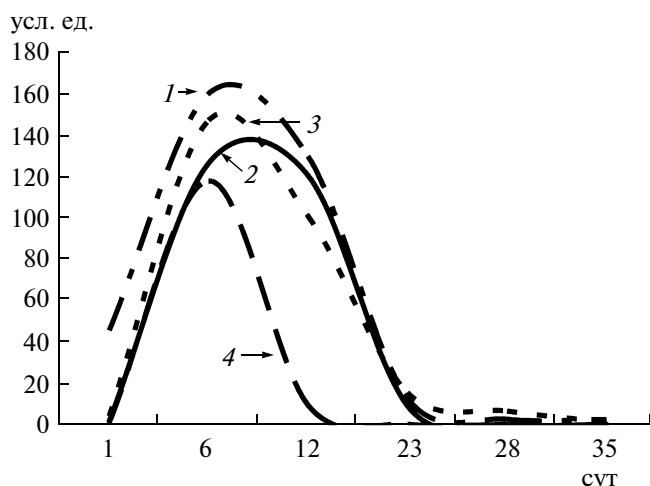


Рис. 3. Интенсивность хемилюминесценции при микробной деструкции дизельного топлива 1 – контроль, 2 – *R. rubropertinctus* ИКВС № 15, 3 – *R. erythropolis* ИКВС № 11, 4 – *G. terrae* ИКВС № 19.

до 23 сут, и этот период совпадал с постепенным истощением нефтепродукта в среде (рис. 3).

В эксперименте с *R. erythropolis* интенсивность хемилюминесценции среды была более выражена, чем в экспериментах со штаммами *G. terrae* и *R. rubropertinctus*. Исходя из результатов химического анализа нефтепродуктов, свидетельствующего об отсутствии потребления субстрата штаммом *R. erythropolis*, снижение интенсивности хемилюминесценции в этом случае можно объяснить естественными процессами, связанными с выбросом из отмирающих бактериальных клеток высокомолекулярных соединений, которые могут служить ловушками для гидропероксидов и свободных радикалов, а также снижать интенсивность хемилюминесценции среды [11]. Отмечено, что интенсивность хемилюминесценции среды в контроле, не содержащем бактерий, снижалась после 12 сут (рис. 3). Происходящее явление, вероятно, связано с процессами автоокисления, протекающими за счет свободных радикалов, а также гидропероксидов, изначально содержащихся в нефтепродукте [12]. Условия эксперимента (рассеянный свет, температура) не способствовали поддержанию процесса автоиницированного окисления, что приводило к постепенному уменьшению гидропероксидов в контроле и снижению интенсивности хемилюминесценции.

Таким образом, деструкция углеводов бактериями сопровождается образованием гидропероксидов.

Динамика каталазной активности микроорганизмов в процессе деструкции дизельного топлива. В процессе деструкции дизельного топлива выявлено снижение каталазной активности бактерий по мере увеличения потребления нефтепродукта,

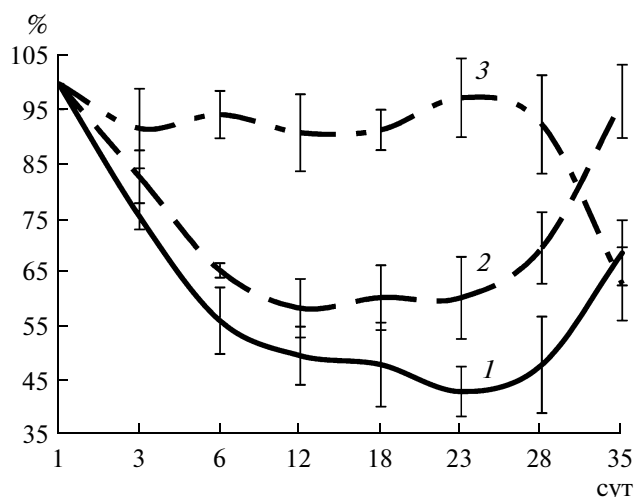


Рис. 4. Динамика каталазной активности штаммов в процессе деструкции дизельного топлива 1 – *G. terrae* ИКВС № 19, 2 – *R. rubropertinctus* ИКВС № 15, 3 – *R. erythropolis* ИКВС № 11.

наиболее выраженное у *G. terrae* и *R. rubropertinctus* (рис. 4).

Исходная каталазная активность *G. terrae* составляла 3.05 ± 0.06 усл. ед., что соответствовало 100%. К 6 сут каталазная активность снизилась на $43.6 \pm 6.14\%$, к 12 сут – на $50.1 \pm 5.36\%$, а к 35 сут эксперимента отмечено увеличение каталазной активности бактерий.

Исходная каталазная активность *R. rubropertinctus* составляла 4.4 ± 0.22 усл. ед., что соответствовало 100%. К 6 сут каталазная активность штамма снизилась на $17.1 \pm 1.33\%$, к 23 сут – на $36.8 \pm 7.58\%$, после чего наблюдалось восстановление уровня каталазной активности до исходного уровня (рис. 4).

У *R. erythropolis* зарегистрировано незначительное снижение каталазной активности только к 35 сут эксперимента, что было связано с отмиранием бактериальной массы (рис. 4).

Таким образом, в процессе проведенных исследований отмечено, что у штамма, не использующего нефтепродукт, численность бактерий и каталазная активность практически не менялись в процессе эксперимента, оставаясь на уровне, близком к исходному. В то же время, для бактерий – активных деструкторов нефтепродуктов характерно увеличение численности бактерий и снижение каталазной активности. Оценка корреляционной зависимости между снижением каталазной активности (% от исходного уровня) и снижением концентрации нефтепродукта (% от исходного уровня) показала сильную положительную связь между этими показателями для *G. terrae* ($r = 0.98$; $p = 0.01$) и *R. rubropertinctus* ($r = 0.93$; $p = 0.05$). Напротив, у штамма *R. erythropolis* эта связь отсутствовала ($r = 0.02$).

Полученные данные позволяют выделить в процессе микробной деструкции 2 стадии. В первую стадию наблюдается высокая интенсивность хемилюминесценции культуральной среды, что свидетельствует об образовании активных форм кислорода в результате окисления субстрата с участием оксигеназ бактерий. При этом регистрируется интенсивное увеличение численности бактерий с одновременным снижением их каталазной активности. Вторая стадия деструкции сопровождается снижением интенсивности хемилюминесценции среды и наступает после потребления большей части субстрата. В эту стадию регистрируется увеличение каталазной активности бактерий на фоне снижения их численности.

Представляет интерес снижение каталазной активности бактерий при одновременном увеличении их численности, наблюдаемое в условиях накопления активных форм кислорода. По-видимому, подобная противофазная динамика указывает на включение альтернативных механизмов клеточной защиты от активных форм кислорода. В условиях окислительного стресса ферментная защита бактериальной клетки с помощью каталазы менее эффективна вследствие быстрой инактивации ферментов и длительного периода времени, необходимого для их повторного накопления [13]. Инактивация каталазы кислородными радикалами и избытком гидропероксидов ранее была показана в работах Н.М. Эмануэля [14]. В нашем исследовании удалось обнаружить еще один механизм снижения каталазной активности в процессе деструкции углеводов, заключающийся в уменьшении экспрессивности этого свойства у бактерий, выделенных из среды с дизельным топливом на твердой питательной среде (без нефтепродуктов). Это свидетельствует о внутривидовых перестройках, направленных на снижение общепопуляционного уровня каталазной активности бактерий. В таких условиях возрастает роль альтернативных антиоксидантов — полисахаридов, трегалозы и миколатов трегалозы [15]. Можно предположить, что в определенные периоды деструкции углеводов бактериями неферментные антиоксиданты осуществляют эффективную защиту от активных форм кислорода, позволяя бактериям не расходовать питательные вещества и энергию на синтез антиоксидантных ферментов, в частности каталазы.

Полученные в работе данные свидетельствуют о том, что снижение каталазной активности углеводородокисляющих бактерий можно рассматривать, поясняя к сказанному, как индикатор интенсивности процесса деструкции нефти и нефтепродуктов. Установленная закономерность была использована для разработки способа выбора штаммов-деструкторов нефти и нефтепродуктов, основанного на снижении каталазной активности бактерий при потреблении углеводов

[16]. С применением данного способа был выделен новый штамм, активно окисляющий нефть и нефтепродукты *G. terrae* ВКПМ Ас-1741 [17].

Таким образом, выявленная закономерность снижения каталазной активности микроорганизмов-деструкторов в процессе деструкции углеводов позволяет рассматривать каталазную активность бактерий в качестве индикатора начального этапа окисления нефтепродуктов, что имеет практическое значение и может использоваться для выбора штаммов-деструкторов с целью создания биопрепаратов, пригодных для ремедиации природных экосистем.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Живая природа” (проект № 12-П-4-1039) и гранта УрО РАН (№ 12-И-4-2034).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Миронов О.Г. // Гидробиол. журн. 2000. Т. 36. № 1. С. 82–96.
2. Пельшенко В.И., Савицкий В.Н., Стецько Н.С., Михайленко В.П. // Гидробиол. журн. 1991. Т. 27. № 6. С. 54–59.
3. Коронелли Т.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 1996. Т. 32. № 6. С. 579–585.
4. Миронов О.Г. // Морской эколог. журн. 2002. Т. 1. № 1. С. 56–66.
5. Современная микробиология. Прокариоты. Т. 1. / Ред. Й. Ленгелер, Г. Древис, Г. Шлегель. М.: Мир, 2005. 656 с.
6. Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989. 288 с.
7. Бухарин О.В., Черкасов С.В., Сгибнев А.В., Забирова Т.М., Иванов Ю.Б. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2000. Т. 130. № 7. С. 80–82.
8. Хайруллин Р.М., Ахметова И.Э. // Биохимия. 2001. Т. 66. № 3. С. 349–353.
9. Глац С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с.
10. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. // Усп. соврем. биол. 1993. № 4(113). С. 442–455.
11. Петров А.А. Углеводороды нефти. М.: Наука, 1984. С. 264.
12. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. // Усп. соврем. естествознания. 2006. № 7. С. 29–36.
13. Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П. // Усп. соврем. биол. 1993. Т. 113. № 4. С. 456–469.
14. Эмануэль Н.М., Денисов Е.Т., Майзус З.К. Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе. М.: Наука, 1965. С. 370.
15. Феофилова Е.П. // Микробиология. 1992. Т. 61. № 5. С. 741–755.
16. Патент РФ. 2011. № 2426781.
17. Патент РФ. 2010. № 2396340.

Catalase Activity of Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria

O. A. Gogoleva, N. V. Nemtseva, and O. V. Bukharin

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, 460000 Russia
e-mail: olik-g@yandex.ru, ikvs@mail.ru.esoo.ru

Received November 21, 2011

Abstract—The dynamics of catalase activity of the hydrocarbon-oxidizing bacteria *Cordona terrae*, *Rhodococcus rubropertinctus*, and *Rhodococcus erythropolis* during petroleum product destruction has been studied. A direct relationship between decreasing catalase activity of hydrocarbon-oxidizing microorganisms and the intensity of petroleum product destruction has been established experimentally. The revealed dependence allows one to consider the catalase activity of bacteria as an indicator of the initial stage of petroleum product oxidation and may be used for choosing destructor strains to construct biopreparations suitable for natural ecosystem remediation.