

УДК 579.841

**НОВЫЙ ШТАММ БАКТЕРИИ РОДА *OCHRORACTRUM*:
СВОЙСТВА И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ**

© Т.Ю. Коршунова, С.Р. Мухаматдьярова, О.Н. Логинов

Из образцов серой лесной почвы, загрязненной дизельным топливом, выделен новый штамм бактерии *Ochrobastrum sp.* ИБ ДТ-5.3/2, изучены его культурально-морфологические, физиолого-биохимические свойства и филогенетическое положение, а также способность к утилизации нефти, нефтяных углеводородов и их производных.

Ключевые слова: штамм *Ochrobastrum sp.* ИБ ДТ-5.3/2, культуральные и физиолого-биохимические свойства, филогенетическое древо.

Интенсивная разработка и добыча углеводородного сырья привели к широкомасштабному загрязнению окружающей среды. В настоящее время вопрос очистки экосистем от нефти и нефтепродуктов стоит очень остро. Наиболее полное, экологически безопасное и экономически обоснованное восстановление нефтезагрязненных биоценозов может быть достигнуто при использовании микроорганизмов-деструкторов, которые способны утилизировать нефтяные углеводороды за счет наличия у них специфических ферментных систем, осуществляющих катаболизм этих труднорастворимых ксенобиотиков [1–2]. От их функциональной активности зависят интенсивность и характер разложения нефтяных углеводородов в почве [3]. В связи с этим особую важность приобретают исследования, направленные на выделение и отбор эффективных микроорганизмов, способных трансформировать и утилизировать нефть и продукты ее переработки.

Углеводородокисляющая активность присуща многим микроорганизмам, относящимся к различным систематическим группам – *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* и др. [4–12]. Они характеризуются способностью к усвоению широкого спектра

углеводородов, включая ароматические, обладают высокой скоростью роста и, следовательно, представляют практический интерес как возможная основа препарата для очистки почв от нефтяных загрязнений.

Выбор микроорганизма-деструктора углеводородов должен проводиться с учетом ряда требований. Во-первых, их применение должно быть абсолютно безопасно для человека и окружающей среды. Т.е. бактерии не должны быть патогенными, способствовать накоплению микробных токсинов, мутагенных или высокотоксичных промежуточных продуктов распада ксенобиотиков, ухудшать экологическую обстановку на восстанавливаемой территории, увеличивать дозу внесения удобрений. Во-вторых, биопрепараты должны быть эффективными, т.е. по скорости и полноте разложения загрязняющих веществ превосходить аборигенные микроорганизмы, обитающие на очищаемом участке. Желательно также иметь возможность контролировать развитие и распространение в рекультивируемом грунте интродуцированных микроорганизмов биопрепарата. Этому может способствовать их хорошо узнаваемая морфология или наличие биохимических маркеров.

В связи с тем что технология микробиологической очистки загрязненных почв осу-

ществляется в естественной природной среде и предусматривает аэробные условия, необходимо вести выбор деструктора среди аэробных или факультативно-аэробных бактерий. Отобранный микроорганизм должен обладать высокой устойчивостью к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды (колебания температуры, влажность, изменение рН среды, недостаточная концентрация биогенных элементов, доступность кислорода, засоленность и пр.).

Целью работы является описание физиолого-биохимических и фенотипических свойств штамма, выделенного из загрязненной дизельным топливом почвы, его предварительная идентификация и исследование способности к утилизации нефти, нефтяных углеводородов и других классов органических соединений.

Условия эксперимента. Из образцов серой лесной почвы, искусственно загрязненной дизельным топливом, методом накопительных культур выделили микроорганизмы, способные использовать дизельное топливо в качестве единственного источника углерода и энергии. Для этого 1 г почвы помещали в колбы (объем 250 мл) со 100 мл жидкой минеральной среды Раймонда [13], куда вносили дизельное топливо в количестве 0,5–1% (по объему). Инкубирование проводили в лабораторном термостатируемом встряхивателе П-5.10-Э5960 при температуре 26–28°C и 160 об./мин в течение 10–14 суток при микроскопическом контроле роста микробного сообщества. Чистые культуры выделяли на агаризованной среде Раймонда, на поверхность которой наносили углеводородный субстрат – 100 мкл стерильного дизельного топлива. Культивирование микроорганизмов на чашках Петри осуществляли при температуре 30°C. Дифференциацию получившихся колоний производили по культурально-морфологическим признакам.

Чистоту выделенных культур проверяли общепринятыми методами – микроскопическим контролем и высевом на агаризованную среду МПА [14].

Идентифицировали чистые культуры микроорганизмов по морфологическим, физиологическим и биохимическим признакам, используя общепринятые руководства [15–18].

Выделение тотальной ДНК из колоний бактерий, выросших на твердой среде МПА, выполняли с помощью комплекта реагентов «РИБО-сорб» торговой марки «АмплиСенс» (Россия), согласно рекомендациям производителя.

Аmplификацию фрагмента гена 16S рРНК производили с использованием бактериальных праймеров: прямого 27F (5'–AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG–3') и обратного 1492R (5'–ACGG(C/T)TACCTTGTACGACTT–3'). ПЦР была выполнена в 25 мкл смеси, состоящей из 1× буфера для *Taq*-полимеразы, 0,25 мМ дНТФ, 1,5 мМ MgCl₂, 0,4 мкМ каждого праймера, 2 ед. акт. *Taq*-полимеразы и 10 нг геномной ДНК, при следующих условиях: 95°C – 5 мин; далее 30 циклов, включающих 30 с при 94°C, 30 с – при 55°C и 1 мин 20 с – при 72°C; затем следовала дополнительная элонгация при 72°C в течение 5 минут.

Определение нуклеотидной последовательности амплифицированных фрагментов гена 16S рРНК осуществляли с применением набора реактивов Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3500 xl (Applied Biosystems, США). Секвенирующую реакцию проводили при следующем режиме: 30 циклов, включающих 94°C – 20 секунд, 55°C – 15 секунд, 60°C – 1 мин. Состав реакционной смеси включал 4 мкл Terminator Ready reaction Mix, 20 нг амплифицированной ДНК-матрицы, 3,2 пкмоль праймера. До конечного объема (10 мкл) доводили деионизированной водой (MiliQ). Продукты секвенирования очищали с помощью набора BigDye® X Terminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, США).

Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК предварительно анализировали, используя пакет программ EzTaxon server 2.1 (<http://147.47.212.35:8080/index.jsp>). Далее сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК с таковыми типовых

штаммов близкородственных видов выполняли с помощью программы CLUSTAL W [19].

Последовательности генов 16S рРНК выравнивали с соответствующими последовательностями ближайших видов бактерий с помощью SINA alignment service (<http://www.arb-silva.de/aligner/>) [20], согласно рекомендациям [21].

Дендрограммы выстраивали в программе MEGA версии 5 методом «присоединения ближайших соседей» (Neighbor-Joining method) [22] с использованием 2-параметрической модели Кимура [23].

Результаты и обсуждение. Из загрязненной дизельным топливом серой лесной почвы выделено 48 изолятов микроорганизмов. В одном из них штамм ИБ ДТ-5.3/2 по совокупности культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств был идентифицирован как *Ochrobactrum sp.* ИБ ДТ-5.3/2.

Клетки штамма представляют собой короткие палочки, по мере старения культуры укорачивающиеся до кокков, одиночные либо в скоплениях, окруженные слизью, 1,2–1,3 × 0,5 мкм. Имеют 1–3 жгутика.

На плотных питательных средах колонии бесцветные, круглые, плоские, гладкие, матовые, с ровными краями.

Грамотрицательные, аэробные, каталазоположительные, неспорообразующие бактерии. Не подвергают гидролизу казеин, крахмал, желатин. Не образуют сероводорода, индола и 3-кетолактозы при окислении лактозы. Потребляют цитрат и малонат. Не обладают липазной и лецитиназной активностью. Образуют кислоту из углеводов, при этом выделяется газ. Разлагают мочевины и твин 20. Реакция Фогес-Проскауэра отрицательная. Способны переносить концентрацию NaCl не более 2,5% и pH среды в пределах 4,3–8,6. Максимальный рост наблюдает-

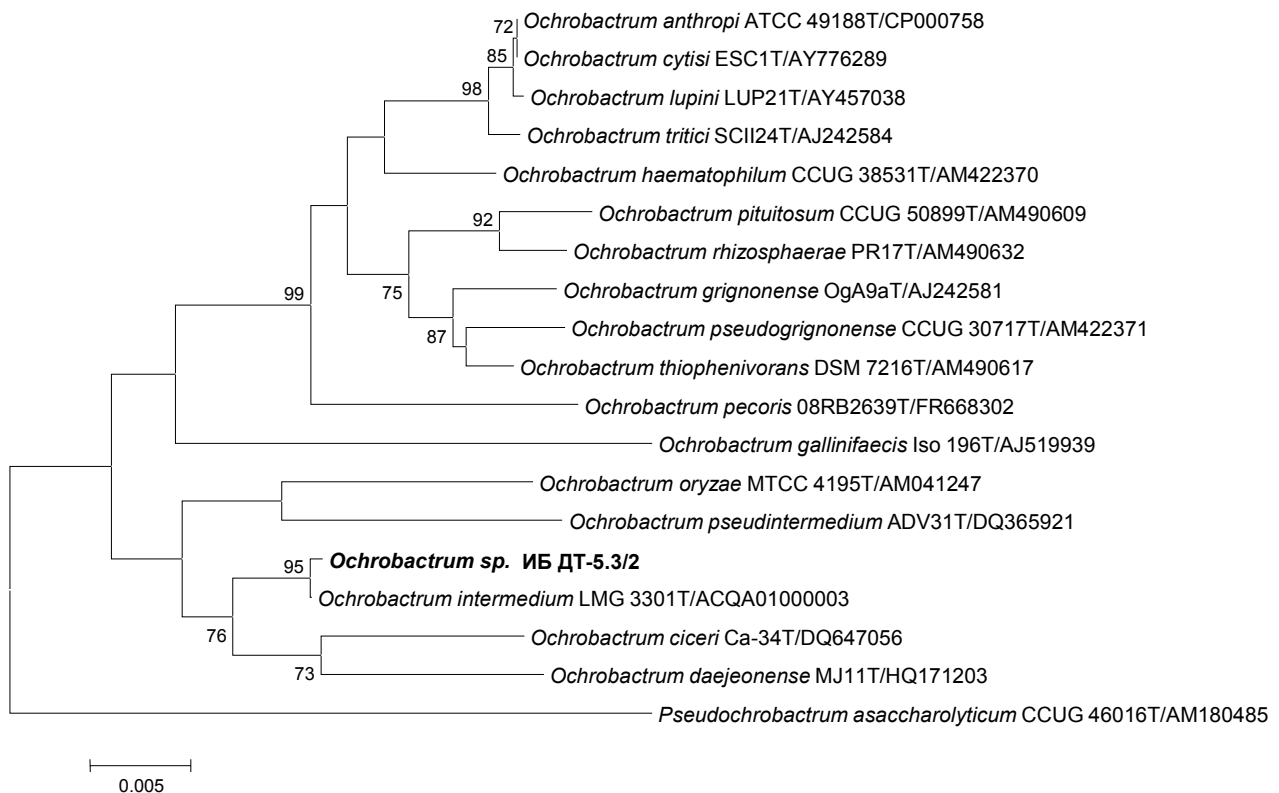


Рис. Филогенетическое положение штамма *Ochrobactrum sp.* ИБ ДТ-5.3/2 на филогенетическом древе рода *Ochrobactrum*, согласно анализу 19 нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью «bootstrap»-анализа (показаны величины показателя «bootstrap»-анализа выше 70%). В качестве внешней группы использована нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК *Pseudochrobactrum asaccharolyticum* CCUG 46016T/AM180485

ся при рН 5,8–7,8. Растет при 10–42°C, оптимум температуры – 26–28°C.

В качестве единственного источника углерода и энергии используют углеводы (сахарозу, D-фруктозу, D-маннозу, D-глюкозу, D-лактозу, L-рамнозу, D-рафинозу, D-галактозу, D-мальтозу, D-ксилозу и L-арабинозу), спирты (сорбит и маннит, глицерин), аминокислоты (D-аланин, D-фенилаланин, DL-серин, DL-метионин). Не развиваются на D-тирозине, DL-триптофане, D-валине.

Обладают устойчивостью к левомицетину, тетрациклину, фузидину, стрептомицину, ванкомицину, канамицину, ампициллину, бензилпенициллину. Чувствительны к ципрофлоксацину.

Утилизируют разнообразные органические вещества: нефть, углеводороды алканового ряда (циклогексан, декан, ундекан, тридекан), хлорпроизводные углеводородов (пентахлорэтан, дихлорэтилен, изобутил хлористый, этиловый эфир трихлоруксусной кислоты), ароматические соединения (бензол, толуол, о-ксилол), спирты (диэтиленгликоль, изопропиловый спирт), кислоты (изовалериановая, масляная). Широкий спектр деструктируемых соединений создает предпосылки для использования штамма *Ochrobactrum sp.* ИБ ДТ-5.3/2 для очистки окружающей среды от различных загрязнителей.

Для более точной идентификации бактерии проведены секвенирование и сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК с известными структурами из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), согласно которым с высокой долей вероятности (99,93%) можно утверждать, что изучаемый микроорганизм относится к роду *Ochrobactrum*.

Для уточнения филогенетического положения нового штамма был проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК видов, относящихся к роду *Ochrobactrum*, и построена дендрограмма. На рисунке видно, что бактерия *Ochrobactrum sp.* ИБ ДТ-5.3/2, возможно, принадлежит к виду *Ochrobactrum intermedium*.

В дальнейшем планируются изучение хемотаксономических характеристик и уточнение видовой принадлежности штамма, а также проверка способности бактерий *Ochrobactrum sp.* ИБ ДТ-5.3/2 к очистке нефтезагрязненной почвы в лабораторных и полевых условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Логинов О.Н., Силищев Н.Н., Бойко Т.Ф., Галимзянова Н.Ф. Биотехнологические методы очистки окружающей среды от техногенных загрязнений. Уфа: Реактив, 2000. 100 с.
2. Калюжин В.А. Биодegradация нефти // Матлы Всерос. науч.-практ. конф. «Исследования эколого-географических проблем природопользования для обеспечения территориальной организации и устойчивости развития нефтегазовых регионов России». Нижневартовск, 2000. С. 44–46.
3. Котелевцев С.В. Нефтяные загрязнения: контроль и реабилитация экосистем. М.: ФИАН, 2003. 194 с.
4. Коронелли Т.В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводородов в окружающей среде // Прикладная биохимия и микробиология. 1996. Т. 32, № 6. С. 579–585.
5. Чугунов В.А., Ермоленко З.М., Жиглецова С.К. и др. Создание и применение жидкого препарата на основе ассоциации нефтеокисляющих бактерий // Прикладная биохимия и микробиология. 2000. Т. 36, № 6. С. 666–671.
6. Барышникова Л.М., Грищенков В.Г., Аринбасаров М.У. и др. Биодegradация нефтепродуктов штаммами-деструкторами и их ассоциациями в жидкой среде // Прикладная биохимия и микробиология. 2001. Т. 37, № 5. С. 542–548.
7. Логинов О.Н., Нуртдинова Л.А., Бойко Т.Ф. и др. Новые микроорганизмы-биодеструкторы для рекультивации нефтезагрязненных поверхностей // Интервал. 2004. № 1 (60). С. 39–42.
8. Иванова Е.С., Есикова Т.З., Гафарова А.Б., Шкидченко А.Н. Мониторинг интродуцированных микроорганизмов-нефтедеструкторов в открытых системах // Биотехнология. 2006. № 3. С. 74–78.
9. Ключаева М.А. Разработка основы биопрепарата для дегradации нефти при загрязнении природных сред: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Уфа, 2009. 24 с.

10. Hanson K.G., Nigan A., Kapadia M., Desai A.J. News & Notes: Bioremediation of Crude Oil Contamination with *Acinetobacter* sp. A3 // *Curr. Microbiol. Issue*. 1997. V. 35, № 3. P. 191–193.
11. Van Hamme J.D., Ward O.P. Physical and metabolic interactions of *Pseudomonas* sp. strain JA5-B45 and *Rhodococcus* sp. strain F9-D79 during growth on crude oil and effect of a chemical surfactant on them // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67, № 10. P. 4874–4879.
12. Margesin R., Labbe D., Schinner F. et al. Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69, № 3. P. 3085–3092.
13. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // *Develop. Industr. Microbiol.* 1961. V. 2, № 1. P. 23–32.
14. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: практ. пособие / под ред. Н.С. Егорова. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1983. 215 с
15. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхардта. М.: Мир, 1984. Т. 3. 264 с.
16. Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н., Лысак Л.В. Методы идентификации и выделения почвенных бактерий. М.: Изд-во МГУ, 1990. 76 с.
17. Определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Хоулта. М.: Мир, 1997. Т. 1–2.
18. The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications / Eds. A. Balows. Berlin; New-York: Springer-Verlag, 1992. V. 1–4.
19. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucleic Acids Res.* 1994. V. 22. P. 4673–4680.
20. Pruesse, E., Peplies, J. and Glöckner, F.O. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes // *Bioinformatics*. 2012. № 28 (14). P. 1823–1829.
21. Tindall B.J., Rosselló-Móra R., Busse H.J. et al. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010. V. 60. P. 249–266.
22. Saitou N. and Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. and Evol.* 1987. V. 4. P. 406–425.
23. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // *J. Mol. Evol.* 1980. V. 16. P. 111–120.



NEW STRAIN OF THE BACTERIUM OF THE GENUS *OCHROBACTRUM*: PROPERTIES AND PHYLOGENETIC SITUATION

© Т.Ю. Korshunova, S.R. Mukhamatdyarova, O.N. Loginov

From grey forest soil samples strain *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 was allocated. Cultural, phenotypical, biochemical and phylogenetic situation of a strain are studied. Ability to utilization of oil, hydrocarbons and their derivatives are shown.

Key words: strain *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2, cultural, physiological, biochemical features, phylogenetic tree.