

УДК 579.6

DOI: 10.31040/2222-8349-2024-0-2-38-47

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ НОВЫХ ШТАММОВ  
УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ****© С.Р. Мухаматдырова, Е.В. Кузина, Ю.Ю. Шарипова,  
М.Г. Искужина, Л.А. Кульбаева, Т.Ю. Коршунова**

Попадание нефти оказывает угнетающее действие на почвенный биоценоз, которое усиливается в присутствии других поллютантов (тяжелые металлы, хлориды, гербициды), что, в конечном итоге, приводит к выводу значительных земельных площадей (включая сельскохозяйственные) из целевого оборота. Для биоремедиации таких территорий необходимы микроорганизмы-нефтедеструкторы, обладающие устойчивостью к дополнительным загрязнителям, а также набором полезных свойств, благодаря которым повышается эффективность очистки и восстановления нарушенных почв. В настоящей работе выделены три изолята, активно растущие в жидкой среде с нефтью. В результате секвенирования нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК достоверно установлено, что все штаммы относятся к виду *Acinetobacter calcoaceticus*. Бактерии показали высокую нефтеокисляющую способность (89.7–97.0%), которую оценивали по степени деструкции алифатической фракции, в том числе в присутствии гербицидов на основе 2,4-дихлор-феноксиуксусной кислоты (Октапон экстра), имазетапира (Тапир) и трибенурон-метила (Спецназ) (степень биодеструкции 40.4–54.1%). Микроорганизмы использовали в качестве источника углерода ароматические углеводороды (в том числе полициклические). Они демонстрировали высокие показатели гидрофобности клеточной поверхности (78–85%) по отношению к гексадекану, проявили эмульгирующую активность более 50%. Бактерии обладали толерантностью к гербицидам Тапир, Спецназ в количестве до 1% объем.(масс.). Гербицид Октапон экстра был более токсичен для бактерий – рост всех штаммов происходил при его концентрации в среде не выше 0.5% объем. Микроорганизмы проявляли резистентность к хлориду натрия в количестве 3.0–5.0% и ионам свинца (1.00–1.25 г/л). Они продуцировали фермент липазу, были способны к фиксации атмосферного азота и растворению неорганического фосфата (в том числе в присутствии нефти или гербицидов). Изученные *Acinetobacter* spp. стимулировали рост ячменя (надземной и подземной части), особенно штамм *A. calcoaceticus* П32 (удлинение побегов и корней на 15.3 и 49.5% соответственно). Полученные данные свидетельствуют о том, что все три штамма имеют определенные перспективы применения для очистки комплексно загрязненных почв.

Ключевые слова: штаммы-нефтедеструкторы, *Acinetobacter calcoaceticus*, тяжелые металлы, хлорид натрия, гербициды, эмульгирующая активность, фосфатмобилизация, ростстимулирующая способность.

Нефть является одним из основных загрязнителей окружающей среды, для которого характерны органическая природа, сложный многокомпонентный состав, токсичность в целом и отдельных компонентов, масштабность распространения и миграционная способность.

При этом попадание нефти в почву чаще всего приводит к комплексному загрязнению, обусловленному как присутствием собственно углеводородов, так и соединений тяжелых металлов, легкорастворимых солей (с преобладанием в солевом комплексе хлорида натрия), а также

МУХАМАТДЪЯРОВА Светлана Ринатовна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,  
e-mail: svetrm@gmail.com

КУЗИНА Елена Витальевна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,  
e-mail: misshalen@mail.ru

ШАРИПОВА Юлияна Юпитеровна, Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,  
e-mail: gerda.666\_09@mail.ru

ИСКУЖИНА Миляуша Галимьяновна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,  
e-mail: ishmurzina82@mail.ru

КУЛЬБАЕВА Лилия Ахметовна, Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,  
e-mail: l.kulbaeva78@mail.ru

КОРШУНОВА Татьяна Юрьевна – д.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,  
e-mail: korshunovaty@mail.ru

остаточных количеств гербицидов в случае аварийных разливов на землях сельскохозяйственного назначения [1]. Каждый из этих поллютантов сам по себе наносит значительный ущерб биологической активности почвы и ингибирует рост растений, а их сочетание может вызывать негативные синергетические эффекты, что, в конечном итоге, приводит к выводу значительных пахотных площадей из целевого оборота [2].

Одной из перспективных технологий очистки нарушенных почв является использование потенциала бактерий для биодegradации нефти. Такие микроорганизмы должны обладать высокой углеводородокисляющей активностью и способностью к росту при определенных значениях температуры и рН среды, а также концентрации солей. Обнаружено очень много бактерий с указанными свойствами, но на сегодняшний день актуальным является поиск и использование штаммов-нефтедеструкторов с дополнительными полезными характеристиками. Например такими, как устойчивость к присутствию других поллютантов (тяжелых металлов, гербицидов) [1], которые могут снижать эффективность бактериального разложения нефти, или продукция штаммами биосурфактантов, улучшающих поступление гидрофобных органических загрязнителей из почв и воды в микробные клетки и, соответственно, их деградацию [3], а также липолитических ферментов, катализирующих гидролиз эфирных связей и, таким образом, участвующих в разложении углеводородов [4]. Кроме того, для ускорения очистки и восстановления нефтезагрязненных почв в последнее время активно используют углеводородокисляющие бактерии, способные к стимуляции роста и развития растений-ремедиантов путем влияния на минеральное питание, синтеза фитогормонов и пр. [5].

В связи с вышеизложенным, целью работы являлось выделение микроорганизмов, активно разлагающих нефть и изучение у них свойств, способствующих повышению эффективности биоремедиации нефтезагрязненных почв, в том числе сельскохозяйственных.

**Объекты и методы исследования.** Объектом исследований служили штаммы бактерий, выделенные методом накопительных культур из образцов грунта [6], отобранных из содового шламохранилища, расположенного на территории Пермского края. Для этого в колбы со 100 мл жидкой минеральной среды Раймонда

[7] с нефтью (2% объем.) в качестве единственного источника углерода и энергии добавляли 2 г почвы, а затем инкубировали при температуре 28°C и 160 об/мин в течение 7 сут. Для выделения бактериальных изолятов проводили высеивание из накопительных культур на мясопептонный агар (МПА) [6], после чего чашки Петри помещали в термостат при 28°C на 5 сут.

Для дальнейших исследований отбирали изоляты, наиболее активно растущие на твердой и жидкой среде Раймонда с нефтью в качестве единственного источника углерода. Интенсивность роста в жидкой среде (нефть 1% объем.) оценивали по изменению состояния среды, нефтяной пленки и сдвигу рН, а также по численности микроорганизмов на 2 и 5 сут культивирования. Проводили высеивание из разведений культуральной жидкости на твердую среду Раймонда, на поверхность которой наносили 100 мкл стерильной нефти и через 5 сут подсчитывали количество сформировавшихся колоний.

Культурально-морфологические свойства бактерий определяли при выращивании на МПА, физиолого-биохимические – по общепринятым методикам [6]. Способность микроорганизмов к росту в широком диапазоне температур выявляли после инкубации на МПА в течение 7 сут при 4 и 41°C.

Видовую принадлежность микроорганизмов устанавливали с помощью секвенирования фрагмента последовательности гена 16S рНК. Тотальную ДНК выделяли по методике, описанной в [7]. Амплификацию фрагмента гена 16S рНК осуществляли с универсальными праймерами 27F и 1492R [8] на амплификаторе С1000 Touch™ Thermal Cycler («Bio-Rad Laboratories», США). Очистку ПЦР-продуктов и последующую секвенирующую реакцию выполняли с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США) по инструкции производителя на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730 («Applied Biosystems», США). Для поиска нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК, гомологичных соответствующим последовательностям исследуемых штаммов, использовали сервер EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>).

Углеводородокисляющую активность штаммов, в том числе в присутствии гербицидов (Октапон экстра – 0.5% объем., Тапир и Спецназ – 1.0% объем.(масс.)), оценивали по степени деструкции алифатической фракции

нефти с помощью метода газовой хроматографии так, как описано [1]. Бактерии культивировали в жидкой среде Раймонда с нефтью (4% объем.) при 28°C в течение 5 сут.

Способность к росту при использовании в качестве источника углерода ароматических углеводов (бензол, толуол, ксилол, фенол, нафталин, фенантрен и бифенил) проверяли визуально (по интенсивности роста в сравнении с контролем) после инкубирования на твердой среде Раймонда при 28°C в течение 7 сут. Соединения добавляли на крышку чашки Петри, чашку переворачивали дном вверх и герметизировали парафиновой лентой для предотвращения улетучивания. Контролем служила та же среда без добавления источника углерода. Для оценки роста использовали разработанную нами шкалу: ++++ обильный рост, +++ хороший рост, ++ умеренный рост, + слабый рост, – рост отсутствует.

Продукцию штаммами липазы обнаруживали по наличию непрозрачной зоны кальциевых солей жирных кислот на среде с Твин 80 [6].

Для определения способности микроорганизмов к синтезу биосурфактантов штаммы выращивали 5 сут на минеральной среде Раймонда с гексадеканом в количестве 1% объем. и при температуре 28°C и 160 об/мин. Супернатант получали центрифугированием культуральной жидкости при 12000 г в течение 10 мин.

Поверхностно-активные свойства изолятов проверяли косвенным методом, основанным на взаимодействии исследуемой жидкости, содержащей ПАВ, с гидрофобным веществом. Для обнаружения биосурфактантов в чашки Петри помещали 20 мл дистиллированной воды, затем вносили 30 мкл нефти. В центр нефтяного пятна добавляли 100 мкл супернатанта культуры микроорганизмов и через 30 с определяли диаметр образовавшейся чистой зоны в пленке нефти [9].

Индекс эмульгирования культуральной жидкости и супернатанта, характеризующий способность микроорганизмов продуцировать биоэмульгаторы, определяли по методике [10]. В мерную пробирку к 4 мл исследуемой жидкости добавляли 4 мл гидрофобного субстрата (н-гексадекана). Полученную смесь интенсивно перемешивали в течение 2 мин и оставляли на 24 ч при комнатной температуре, после чего определяли индекс эмульгирования, рассчитываемый как процентное отношение высоты слоя эмульсии к общей высоте слоя жидкости в пробирке.

Гидрофобность клеточной поверхности устанавливали с помощью МАТН-теста (Microbial Adherence to Hydrocarbon) с модификациями [11]. После 5 сут культивирования штаммов в условиях, описанных выше, содержимое колб центрифугировали 10 мин при 12000 г. Клеточную биомассу дважды отмывали дистиллированной водой и ресуспендировали в фосфатно-магниевом буфере (рН 7.0) так, чтобы значение оптической плотности (при 600 нм) клеточной суспензии всех образцов было в пределах 0.48–0.50. К 3 мл клеточной суспензии добавляли 0.5 мл н-гексадекана. Содержимое пробирок интенсивно встряхивали 3 мин и оставляли для разделения фаз на 10 мин при температуре 37°C. Аккуратно пипеткой отбирали 3 мл нижней водной фракции и измеряли ее оптическую плотность при 600 нм. Степень адгезии клеток (гидрофобность клеточной поверхности, Н) рассчитывали по формуле:

$$H(\%) = \left(1 - \frac{ОП1}{ОП0}\right) \cdot 100\%,$$

где ОП0, ОП1 – оптическая плотность клеточной суспензии до и после добавления н-гексадекана соответственно. В качестве контрольного образца использовали буферный раствор.

Устойчивость штаммов к действию гербицидов выявляли визуально по интенсивности роста на МПА с добавлением различных концентраций препаратов (от 0.1 до 1% объем.(масс.)). Использовали препараты российского производства: Октапон экстра (производитель ООО «АХК-АГРО»), действующее вещество (д.в.) 2,4-дихлор-феноксисукусная кислота (2,4-Д); Тапир (ООО «Агро Эксперт Групп»), д.в. имазетапир; Спецназ (ООО «Евроагрокемикалс»), д.в. трибенурон-метил.

Устойчивость штаммов к тяжелым металлам (ТМ) (Zn, Co, Cd, Pb, Cu, Ni) и хлориду натрия устанавливали визуально (по наличию роста по штриху) на среде МПА с NaCl или солями этих металлов (ZnSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, Cd(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O) после инкубации в течение 7 сут при 28°C. Концентрацию NaCl варьировали в пределах 3–7%, ионов металлов 0.25–1.50 г/л.

Способность к азотфиксации, в т.ч. в присутствии нефти или гербицидов (0.5 и 1% объем.), выявляли по увеличению численности микроорганизмов при их росте на среде Эшби, которая не содержит ни органического, ни минерального азота [6].

Способность к растворению неорганических фосфатов определяли на среде Пиковской со свежесажженным ортофосфатом кальция через 10 сут культивирования путем расчета индекса солюбилизации (SI), т.е. отношения диаметра зоны просветления вокруг колонии бактерий (мм) к диаметру колонии (мм). Для исследования влияния загрязнителей на фосфатмобилизирующую активность бактерий гербициды добавляли в среду перед тем, как разливать в чашки Петри (0.5 и 1% объем.), а нефть наносили на поверхность застывшей агаризованной среды (250 мкл). Принимали, что при  $SI < 2$  изолят обладает низким,  $SI$  равен 2–3 – средним, если  $SI > 3$  – высоким потенциалом солюбилизации [1].

Содержание индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) в культуральной жидкости анализировали хроматографически в системе ВЭЖХ LC-20 Prominence с диодно-матричным детектором SPD-M20A («Shimadzu», Япония) так, как это было описано в [12].

Наличие у штаммов способности к стимуляции роста растений проверяли на семенах ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Челябинский 99, которые замачивали 15 мин в жидкой культуре бактерий, разбавленной до титра  $10^4$  КОЕ/мл. Контрольные семена обрабатывали аналогичным образом стерильной водопроводной водой. Семена помещали по 20 шт. во влажные камеры и инкубировали при 24–26°C в течение 3 сут, после чего определяли количество проросших семян (%), длину побегов и суммарную длину корней.

Эксперименты выполняли в трехкратной повторности. Статистическую обработку проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010. В табл. 5 данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента ( $p < 0.05$ ).

**Результаты и обсуждение.** Из 22 визуально различающихся при выращивании на МПА изолятов для дальнейших исследований были отобраны 3 культуры, обозначенные как П21, П25, П32, которые характеризовались наиболее интенсивным ростом на агаризованной и жидкой среде Раймонда с нефтью.

При их культивировании в жидкой среде прослеживалось практически полное исчезновение нефтяной пленки на ее поверхности и на стенках колб, диспергирование нефти, помутнение среды, образование хлопьев. Также в процессе разложения углеводов нефти в жид-

кой среде наблюдалось снижение pH с 6.6 до 5.2–5.4 и активный рост изолятов, численность которых (начальный титр  $1\text{--}2 \times 10^3$  КОЕ/мл) на 2 сут достигла  $5\text{--}6 \times 10^8$  КОЕ/мл и сохранялась в течение 5 сут инкубирования.

В результате изучения морфологических и культуральных характеристик отобранных изолятов установлено, что они являются граммотрицательными палочками диаметром 0.6–1.5 и длиной 1.2–2.2 мкм и не образуют спор. На плотной питательной среде формируют круглые колонии молочного цвета, диаметром от 3 до 5 мм, с ровными краями и гладкой поверхностью, блестящей у штамма П32.

Все изоляты являются каталазоположительными, оксидазоотрицательными. Не подвергают гидролизу казеин, крахмал, карбоксиметилцеллюлозу, желатин, являются аэробами, способны в качестве источника углерода и энергии использовать не только углеводы (D-глюкозу, сахарозу), но и органические кислоты (цитрат, малонат, глутарат, L-гистидин, L-аспартат, L-тирозин,  $\beta$ -аланин, L-орнитин, L-аргинин, L-лейцин,  $\gamma$ -аминобутират). При использовании глюкозы газ не образуют. Растут в широком диапазоне температур 4–41°C.

В результате секвенирования нуклеотидной последовательности гена 16S рНК достоверно установлено, что все штаммы относятся к виду *Acinetobacter calcoaceticus* (уровень их сходства с типовым штаммом вида *A. calcoaceticus* DSM 30006 составил 99.93–100%).

Все бактерии обладали значительной способностью к разложению нефти в жидкой среде (табл. 1), которая была несколько ниже у штамма П32.

Штаммы *A. calcoaceticus* П21, П25, П32 активнее росли в присутствии бензола, фенола, нафталина, бифенила, антрацена и фенантрена в сравнении с контролем (без источника углерода), толуол оказывал на них токсическое действие (табл. 2).

Штаммы П21, П25, П32 синтезировали липазу. Это является их дополнительным преимуществом как нефтедеструкторов, благодаря тому, что этот фермент участвует в разложении углеводов. Так, известно [4], что липаза, продуцируемая *Acinetobacter* spp., *Mycobacterium* spp. и *Rhodococcus* spp., применялась для деструкции углеводов при разливах нефти. Кроме того, липазную активность микроорганизмов используют в качестве индикатора процессов биологического разложения углеводов.

*Нефтеокисляющая активность штаммов A. calcoaceticus, в том числе в присутствии гербицидов*

Вариант	Штамм			
	П21	П25	П32	
Степень биодеструкции нефти, %	Нефть 4%	97.0	95.3	89.7
	Нефть 4% + Спецназ 1% масс.	95.1	96.9	90.4
	Нефть 4% + Октапон экстра 0,5% объем.	43.2	40.4	45.2
	Нефть 4% + Тапир 1% объем.	49.2	45.2	54.1

Т а б л и ц а 2

*Рост на плотной минеральной среде штаммов A. calcoaceticus в присутствии различных ароматических углеводов*

Вариант	Контроль	Бензол	Фенол	Нафталин	Бифенил	Антрацен	Фенантрен	Толуол
П21	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	–
П25	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	–
П32	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	–

Способность микроорганизмов использовать гидрофобные соединения обусловлена двумя механизмами: поглощением субстрата в результате прямого взаимодействия клеток с каплями углеводорода и облегчением поступления в клетку водонерастворимых веществ за счет их эмульгирования (солюбилизации) синтезированными микроорганизмами биосурфактантами или биоПАВ [3].

Для первичного определения способности микроорганизмов к синтезу биосурфактантов, повышающих доступность углеводов для клеток, используют простые методы обнаружения ПАВ, основанные на характеристике физико-химических свойств систем, содержащих биосурфактанты (поверхностная и эмульгирующая активность, гидрофобность клеточной поверхности). В работе [3] продемонстрировано, что метод вытеснения нефти является простым, быстрым и надежным для выявления биосурфактантов, в том числе при их небольших концентрациях и низкой активности. У изучаемых бактерий было обнаружено образование чистых зон в пленке нефти (табл. 3), что подтверждает их способность продуцировать ПАВы, количественное содержание и химический состав которых может варьироваться в зависимости от условий культивирования штаммов-продуцентов и состава питательной среды.

Штаммы были способны стабилизировать эмульсии в системе: культуральная жидкость – гексадекан (1:1). При этом все они проявили эмульгирующую активность более 50%, что

является показателем высокой продукции био-ПАВ [3]. Лучший показатель 67.5% отмечен у штамма П32, а у П21 и П25 – 57.5% и 54.8% соответственно. Эмульгирующую активность проявили и их супернатанты, что указывает на образование микроорганизмами внеклеточных эмульгаторов, секретируемых в среду (табл. 3).

Биосурфактанты, связанные с клеточной стенкой, могут увеличивать гидрофобность клеточной поверхности, что способствует адгезии бактерий к углеводородам нефти, обеспечивает тесный контакт клеток с субстратом, облегчает поглощение углеводов [3]. Исследуемые штаммы демонстрировали высокие показатели гидрофобности клеточной поверхности (78–85%) по отношению к гексадекану (табл. 3).

Таким образом, изучаемые бактериальные штаммы обладают способностью к образованию клеточносвязанных и экстрацеллюлярных ПАВ (биоэмульгаторов), обладающих эмульгирующей активностью, что способствует улучшению поглощения водонерастворимых субстратов, в том числе углеводов нефти [3]. Полученные данные подтверждают результаты других исследований [11], согласно которым многие представители рода *Acinetobacter* продуцируют биоэмульгаторы, такие как, например, эласан, биодисперсан, которые эмульгируют широкий спектр гидрофобных соединений (в том числе углеводов). Они широко используются в нефтяной и добывающей промышленности.

Поверхностно-активные свойства и эмульгирующая способность штаммов *A. calcoaceticus*

Штамм	Диаметр чистой зоны в нефтяной пленке, мм	Индекс эмульгирования культуральной жидкости, %	Индекс эмульгирования бесклеточного супернатанта, %	Гидрофобность клеточной поверхности, %
П21	15±1	57.5	45.0	78
П25	12±1	54.8	37.5	81
П32	17±1	67.5	62.5	85

В формировании плодородия почвы, ее питательного режима большое значение имеет микробиологическая активность, которая снижается при поступлении загрязняющих веществ. Комбинированное воздействие различных поллютантов может вызывать негативные потенцирующие эффекты. Это приводит к уменьшению общего содержания почвенных микроорганизмов, их видового разнообразия, интенсивности микробиологических процессов, активности почвенных ферментов [2]. Поэтому подбор штаммов-нефтедеструкторов, адаптированных к выживанию в присутствии остаточных количеств гербицидов, тяжелых металлов и в условиях повышенной минерализации является важным подготовительным этапом при проведении биоремедиации.

Широкомасштабное использование гербицидов для борьбы с сорной растительностью на посевах различных сельскохозяйственных культур приводит к накоплению в почве их остаточных количеств, которые являются токсичными для растений и микроорганизмов [1]. Отобранные бактерии обладали толерантностью к гербицидам Тапир в количестве не более 1% объем. Спецназ – менее 1% масс. Что касается гербицида Октапон экстра, то рост всех штаммов происходил только в том случае, если его концентрация не превышала 0.5% объем.

Отмечено, что внесение в среду с нефтью гербицида Спецназ не оказало значимого влияния на процесс биодеструкции углеводородов. Наличие гербицидов Октапона экстра и Тапира замедляло разложение нефти (окислительная активность снизилась приблизительно в 2 раза). Вероятно, это связано с их ингибирующим действием на окислительные ферменты, отвечающие за деградацию углеводородов (табл. 1). Но при этом штамм П32 продемонстрировал более высокую степень биодеструкции нефти по сравнению со штаммами П21 и П25.

При высоких концентрациях все ТМ, попадающие в почву при разливах нефти или при

внесении металлосодержащих гербицидов, токсичны для микроорганизмов. Угнетающее воздействие токсикантов проявляется в изменении конформационных структур нуклеиновых кислот и белков, в нарушении окислительно-восстановительных процессов и осмотического баланса клеток, что приводит к их гибели [1]. Все изучаемые *Acinetobacter* spp. оказались способны к росту при наличии в среде ионов никеля, меди, кобальта, отнесенных ко 2 классу опасности (вещества умеренно опасные), а также кадмия, цинка (вещества высокоопасные) (ГОСТ 17.4.1.02-83) в количестве не более 0.25 г/л. Штаммы П25 и П32 проявили устойчивость к свинцу в концентрации 1.25 г/л, а штамм П21 – до 1.00 г/л, несмотря на то что, согласно ГОСТ 17.4.1.02-83, он как цинк и кадмий, относится к первому классу токсичности.

Легкорастворимые соли, часто попадающие в почву при добыче нефти с сопутствующей пластовой водой, оказывают как прямое негативное воздействие на микроорганизмы в результате повышения осмотического давления почвенных растворов и токсичности отдельных ионов, так и косвенное влияние, связанное с изменением в засоленных почвах физико-химических свойств, что создает неблагоприятные условия для бактерий [1]. Выделенные в данной работе штаммы-нефтедеструкторы оказались устойчивыми к присутствию в среде NaCl в количестве 5%, что позволяет говорить о перспективах их использования для очистки почв, подвергшихся засолению.

Из всех элементов минерального питания азот является самым значимым для жизни растений, и он же является, как правило, самым дефицитным, и, следовательно, лимитирующим рост культур элементом. Азотфиксирующие бактерии играют важную роль в круговороте азота в природе, связывая недоступный растениям атмосферный азот и выделяя его в связанном виде в форме ионов аммония в почву. Присутствие дiazотрофных микроорганизмов, компенсирующих

недостаток азота в почвенной среде, стимулирует рост углеводородокисляющих бактерий, ускоряет деструкцию нефти и повышает биологическую активность почвы [1, 14]. Все бактерии активно росли на среде без источника азота (титр клеток увеличился на 4 порядка с  $10^2$  до  $10^6$  КОЕ/мл). В присутствии нефти (0,5 и 1% объем.) их численность возрастала на 1–2 порядка по сравнению с контролем (до  $10^7$ – $10^8$  КОЕ/мл). При добавлении в среду гербицидов Тапир (0,5 и 1% объем.) и Спецназ (0,5 и 1% масс.) количество клеток штаммов либо сохранялось на прежнем уровне, либо тоже возрастало на 1–2 порядка (до  $10^7$ – $10^8$  КОЕ/мл). Однако при внесении Октапона экстра, оказывающего токсическое воздействие на бактерии, титр снижался на 3–5 порядка (до  $10^1$ – $10^3$  КОЕ/мл). Таким образом, штаммы способны к активному росту и при наличии поллютантов в питательной среде без внесения дополнительных источников азота, что может косвенно свидетельствовать о способности к фиксации атмосферного азота и является важным при биоремедиации нефтезагрязненных почв, в которых возрастает отношение углерода к азоту и устанавливается режим дефицита азота для углеводородокисляющих микроорганизмов.

Фосфор является вторым по значимости среди макроэлементов, необходимых для роста растений. Он содержится в почве в виде труднодоступных минеральных и органических соединений. Почвенные микроорганизмы путем солюбилизации за счет секреции ими кислых метаболитов и щелочных фосфатаз, повышают его доступность для растений, тем самым влияя на их урожайность [1, 14]. Было обнаружено растворение отобранными штаммами неорганических фосфатов, что выражалось в образовании вокруг их колоний прозрачных зон, свободных от нерастворимых солей фосфора. Изоляты обладали средним потенциалом солюбилизации, SI составил 2.0–2.2 (табл. 4). В присутствии нефти SI снизился незначительно в 1.1–1.2 раза. Солюбилизация фосфатов наименее активно шла при наличии гербицида Тапир, SI уменьшился в среднем в 1.3–1.4 раза. Октапон экстра также оказывал некоторый ингибирующий эффект на фосфатмобилизирующую активность, SI снизился в среднем в 1.1–1.2 раза. А в присутствии Спецназа в меньшей концентрации (0.5% масс.) этот показатель остался на контрольном уровне, незначительное его снижение отмечено при использовании это-

го гербицида в количестве 1% масс. у штаммов П21 и П32 (в 1.2 и 1.1 раза соответственно) (табл. 4).

Растения-ремедианты извлекают ксенобиотики из загрязненных почв корнями, аккумулируют токсиканты в своей биомассе, поэтому большое количество зеленой массы (которая может скашиваться несколько раз за сезон для удаления токсических элементов), ее высокая скорость роста и развитая корневая система важны для эффективного протекания процесса очистки почвы. Корни растений за счет выделения экссудатов способствуют возрастанию численности микроорганизмов, обеспечивающих минерализацию сложных органических молекул, в том числе поллютантов и продуцируют ферменты, осуществляющие деградацию органических субстратов, находящихся в почве. Кроме того, они увеличивают пористость почвы, что усиливает массовый перенос субстрата и акцепторов электронов в процессе окисления компонентов нефти [5].

Синтезируемые микроорганизмами вещества могут выступать в роли регуляторов роста у растений. Есть свидетельства, что экзогенные ауксины помогают растениям преодолеть стресс, вызванный засухой, засолением, а также нефтяным загрязнением [5]. По литературным данным, уровень продукции ауксинов у бактерий может значительно варьировать – от десятков до десятков тысяч нг/мл. Обычно положительно влияют на рост растений штаммы, синтезирующие сотни нг/мл ИУК [14, 15]. При этом есть свидетельства, что увеличение секреции бактериями этого гормона более 1000–2000 нг/мл не приводит к дальнейшему усилению стимулирующего эффекта [15]. В настоящей работе ИУК была обнаружена в культуральной жидкости всех трех микроорганизмов в количестве около 150 нг/мл, что является довольно низким показателем продукции этого соединения. Тем не менее, даже несмотря на отсутствие положительного влияния на всхожесть, все штаммы способствовали возрастанию длины побегов и корней растений ячменя, вероятно, за счет продукции каких-либо других биологически активных веществ или иных ростстимулирующих механизмов. В случае применения П21 и П25 этот эффект был незначительным (удлинение побегов на 6.3–8.2%, корней – на 17.5–23.7%), в то время как обработка штаммом П32 приводила к увеличению надземной и подземной частей растений на 15.3 и 49.5% соответственно (табл. 4).

Влияние нефти и гербицидов на фосфатмобилизующую активность штаммов *A. calcoaceticus*

Штамм	Индекс солиubilизации							
	Контроль	Нефть	Спецназ		Октапон экстра		Тапир	
			0.5%	1%	0.5%	1%	0.5%	1%
П21	2.1±0.1	1.8±0.1	2.0±0.1	1.8±0.1	2.0±0.1	1.8±0.1	1.5±0.1	1.5±0.1
П25	2.0±0.1	1.7±0.1	2.0±0.1	2.0±0.1	1.6±0.1	1.8±0.1	1.6±0.1	1.4±0.1
П32	2.2±0.1	2.0±0.1	2.1±0.1	2.0±0.1	1.8±0.1	1.8±0.1	1.6±0.1	1.5±0.1

Влияние бактеризации штаммами *A. calcoaceticus* на всхожесть и ростовые параметры растений ячменя

Штамм	Всхожесть, %	Длина, мм	
		корень (суммарно)	побег
Контроль	97.8±3.6	206±10	26.9±1.1
П21	95.6±3.2	242±12	29.1±1.5
П25	95.6±4.1	255±11	28.6±1.7
П32	80.0±3.9	308±14	31.0±1.4

**Заключение.** Из образцов почв выделены и идентифицированы штаммы микроорганизмов *Acinetobacter calcoaceticus* П21, П25 и П32, которые разлагают нефть (на 89.7–97.0%), в том числе в присутствии гербицидов Октапон экстра, Тапир и Спецназ (на основе 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, имазетапира и трибенурон-метила соответственно) (на 40.4–54.1%), используют ароматические углеводороды (в том числе полициклические) в качестве источника углерода, продуцируют биоэмульгаторы и липазу, способствующие окислению нефти и нефтепродуктов. Помимо этого, бактерии обладают набором других полезных свойств, таких как азотфиксация, фосфатмобилизация, которая сохраняется в присутствии дополнительных поллютантов (нефти или гербицидов), устойчивость к NaCl (3–5%) и ионам свинца (1.00–1.25 г/л). Также штаммы оказывают положительное влияние на формирование проростков ячменя, стимулируя рост надземной и подземной части этого растения, особенно *A. calcoaceticus* П32 (удлинение побегов и корней на 15.3 и 49.5% соответственно)

Полученные результаты свидетельствуют об определенных перспективах применения штаммов *A. calcoaceticus* П21, П25, П32 для ликвидации последствий углеводородного загрязнения, в том числе на землях сельскохозяйственного назначения, а также совместно с растениями-ремедиантами.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00130, <https://rscf.ru/project/23-24-00130/>

#### Литература

1. Коршунова Т.Ю., Кузина Е.В., Шарипова Ю.Ю., Мухаматдьярова С.Р., Искужина М.Г., Гаршин М.В. Бактерии-нефтедеструкторы с устойчивостью к присутствию дополнительных поллютантов // Известия Уфимского научного центра РАН. 2023. № 3. С. 42–49. <https://doi.org/10.31040/2222-8349-2023-0-3-42-49>
2. Терехова В.А., Кулачкова С.А., Морачевская Е.В., Кирюшина А.П. Методология биодиагностики почв и особенности некоторых методов биоиндикации и биотестирования (обзор) // Вестник Московского университета. Серия 17. Почвоведение. 2023. № 2. С. 35–45.
3. Лыонг Т.М., Нечаева И.А., Понаморева О.Н. Методы скрининга биосурфактант-продуцирующих бактерий (мини обзор) // Известия ТулГУ. Естественные науки. 2019. Вып. 4. С. 98–111.
4. Vamitale O.M., Ayomikun A.M. Biodegradation potential of tropical hydrocarbon degrading *Providencia stuartii* // Trends in Applied Sciences Research. 2020. V. 15. P. 253–259. <https://doi.org/10.3923/tasr.2020.253.259>
5. Kuzina E., Rafikova G., Vysotskaya L., Arkhipova T., Bakaeva M., Chetverikova D., Kudoyarova G., Korshunova T., Chetverikov S. Influence of hydrocarbon-oxidizing bacteria on the growth, biochemical characteristics, and hormonal status of barley plants and the content of petroleum hydrocarbons in the soil. 2021. V. 10. № 8. <https://doi.org/10.3390/plants10081745>



6. Практикум по микробиологии / под ред. А.И. Нетрусова. М.: Академия. 2005. 602 с.
7. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // *Development Industrial Microbiology*. 1961. V. 2. № 1. P. 23–32.
8. Wilson K. Current protocols in molecular biology / Eds. F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl. New York: Green Publishing Associates. 2003. P. 241–245.
9. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // *Nucleic acid techniques in bacterial systematic* / Eds. E. Stackebrandt, M. Goodfellow. Chichester: John Wiley and Sons, Ltd. 1991. P. 115–177.
10. Morikawa M., Hirata Y., Imanaka T. A. Study on the structurefunction relationship of lipopeptide biosurfactants // *Biochim Biophys Acta*. 2000. V. 1488. № 3. P. 211–8.
11. Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species // *App Environ Microbiol*. 1987. V. 53. № 2. P. 224–233.
12. Satpute S.K., Banpurkar A.G., Dhakephalkar P.K., Banat I.M., Chopade B.A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review // *Crit Rev Biotechnol*. 2010. V. 30. № 2. P. 127–144.
13. Стариков С.Н., Четвериков С.П. Штамм *Enterobacter* sp. Uom-3 способен к синхронной деструкции галогенсодержащих гербицидов и синтезу индол-3-уксусной кислоты // *Экобиотех*. 2020. Т. 3. № 4. С. 716–721. <https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-4-716-721>
14. Зунг Х.Т., Канарский, А.В., Канарская З.А., Щербakov А.В., Щербakova Е.Н. Ключевой стимулятор роста растений-ризобактерии // *Вестник Поволжского государственного технологического университета. Серия: Лес. Экология. Природопользование*. 2020. Т. 3. № 47. С. 58–73.
15. Ali B., Sabri A.N., Ljung K., Hasnain S. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. // *Letters in Applied Microbiology*. 2009. V. 48. № 5. P. 542–547. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02565.x>
3. Lyong T.M., Nechaeva I.A., Ponamoreva O.N. Metody skrininga biosurfaktant-produtsiryuyushchikh bakteriy (mini obzor) // *Izvestiya TulGU. Estestvennye nauki*, 2019, iss. 4, pp. 98–111.
4. Bamitale O.M., Ayomikun A.M. Biodegradation potential of tropical hydrocarbon degrading *Providencia stuartii* // *Trends in Applied Sciences Research*, 2020, vol. 15, pp. 253–259. <https://doi.org/10.3923/tasr.2020.253.259>
5. Kuzina E., Rafikova G., Vysotskaya L., Arkhipova T., Bakaeva M., Chetverikova D., Kudoyarova G., Korshunova T., Chetverikov S. Influence of hydrocarbon-oxidizing bacteria on the growth, biochemical characteristics, and hormonal status of barley plants and the content of petroleum hydrocarbons in the soil, 2021, vol. 10, no. 8, <https://doi.org/10.3390/plants10081745>
6. Практикум по микробиологии / Нетрусова А.И., editor. Moscow: Akademiya. 2005. 602 p.
7. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // *Development Industrial Microbiology*, 1961, vol. 2, no. 1, pp. 23–32.
8. Wilson K. Current protocols in molecular biology / Eds. F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl. New York: Green Publishing Associates, 2003, pp. 241–245.
9. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // *Nucleic acid techniques in bacterial systematic* / Stackebrandt E., Goodfellow M., editors Chichester: John Wiley and Sons, Ltd., 1991, pp. 115–177.
10. Morikawa M., Hirata Y., Imanaka T. A. Study on the structurefunction relationship of lipopeptide biosurfactants // *Biochim Biophys Acta*, 2000, vol. 1488, no. 3, pp. 211–8.
11. Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species // *App Environ Microbiol*, 1987, vol. 53, no. 2, pp. 224–233.
12. Satpute S.K., Banpurkar A.G., Dhakephalkar P.K., Banat I.M., Chopade B.A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review // *Crit Rev Biotechnol*, 2010, vol. 30, no. 2, pp. 127–144.
13. Starikov S.N., Chetverikov S.P. Shtamm *Enterobacter* sp. Uom-3 sposoben k sinkhronnoy destruktzii galogensoderzhashchikh gerbitsidov i sintezu indol-3-uksusnoy kisloty // *Ekobiotekh*, 2020, vol. 3, no. 4, pp. 716–721. <https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-4-716-721>
14. Zung Kh.T., Kanarskiy, A.V., Kanarskaya Z.A., Shcherbakov A.V., Shcherbakova E.N. Klyuchevoyy stimulyator rosta rasteniy-rizobakterii // *Vestnik Povolzhskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo universiteta. Seriya: Les. Ekologiya. Prirodopol'zovanie*, 2020, vol. 3, no. 47, pp. 58–73.
15. Ali B., Sabri A.N., Ljung K., Hasnain S. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. // *Letters in Applied Microbiology*, 2009, vol. 48, no. 5, pp. 542–547. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02565.x>

## References

1. Korshunova T.Yu., Kuzina E.V., Sharipova Yu.Yu., Mukhamat'yarova S.R., Iskuzhina M.G., Garshin M.V. Bakterii-neftedestruktory s ustoychivost'yu k prisutstviyu dopolnitel'nykh pollyutantov // *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN*, 2023, no. 3, pp. 42–49. <https://doi.org/10.31040/2222-8349-2023-0-3-42-49>
2. Terekhova V.A., Kulachkova S.A., Morachevskaya E.V., Kiryushina A.P. Metodologiya biodiagnostiki pochv i osobennosti nekotorykh metodov bioindikatsii i biotestirovaniya (obzor) // *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 17. Pochvovedenie*, 2023, no. 2, pp. 35–45.



**BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF NEW STRAINS  
OF HYDROCARBON-OXIDIZING BACTERIA**

© S.R. Mukhamatdyarova, E.V. Kuzina, M.G. Iskuzhina,  
Yu.Yu. Sharipova, L.A. Kulbaeva, T.Yu. Korshunova

Ufa Institute of biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre  
of the Russian Academy of Sciences,  
69, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

The ingress of oil has a depressing effect on the soil biocenosis, which is enhanced in the presence of other pollutants (heavy metals, chlorides, herbicides), which ultimately leads to the withdrawal of significant land areas (including agricultural ones) from the target turnover. For the bioremediation of such areas, oil-degrading microorganisms are needed that are resistant to additional pollutants, as well as a set of useful properties that increase the efficiency of cleaning and restoring disturbed soils. In this work, three isolates were isolated that actively grew in a liquid medium containing oil. As a result of sequencing the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene, it was reliably established that all strains belong to the species *Acinetobacter calcoaceticus*. The bacteria showed a high oil-oxidizing ability (89.7–97.0%), which was assessed by the degree of destruction of the aliphatic fraction, including in the presence of herbicides based on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (Octapon extra), imazethapyr (Tapir) and tribenuron-methyl (Special forces) (degree of biodestruction 40.4–54.1%). Microorganisms used aromatic hydrocarbons (including polycyclic ones) as a carbon source.

They demonstrated high cell surface hydrophobicity (78–85%) with respect to hexadecane and exhibited emulsifying activity of more than 50%. The bacteria were tolerant to the herbicides Tapir and Spetsnaz in amounts up to 1% volume (mass). The herbicide Octapon extra was more toxic to bacteria – the growth of all strains occurred at its concentration in the medium not higher than 0.5% volume. Microorganisms showed resistance to sodium chloride in an amount of 3.0–5.0% and lead ions (1.00–1.25 g/l). They produced the enzyme lipase and were capable of fixing atmospheric nitrogen and dissolving inorganic phosphate (including in the presence of oil or herbicides). The studied *Acinetobacter* spp. stimulated the growth of barley (aboveground and underground parts), especially the *A. calcoaceticus* strain P32 (elongation of shoots and roots by 15.3 and 49.5%, respectively). The data obtained indicate that all three strains have certain prospects for use in the purification of complexly contaminated soils.

Keywords: oil-degrading strains, *Acinetobacter calcoaceticus*, heavy metals, sodium chloride, herbicides, emulsifying activity, phosphate mobilization, growth-stimulating ability.