

УДК 579:57.033

**ВЛИЯНИЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ СФАГНОВОГО ПЕРЕХОДНОГО ТОРФА НА РОСТ
ШТАММА-НЕФТЕДЕСТРУКТОРА RHODOCOCCUS SP. X5 ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

Е.В. Акатова, Ю.А. Пронькина, К.Р. Семенова, М.М. Герцен, Е.Д. Дмитриева

Тульский государственный университет, Тула, Россия.

Гуминовые вещества (ГВ), образующиеся при разложении животных и растений под действием микроорганизмов и абиотических факторов окружающей среды, представляют собой сложные высокомолекулярные органические соединения с нерегулярной структурой. ГВ в большом количестве содержатся в твердых горючих ископаемых (горючих сланцев, ископаемых углей, торфов) [1, 2].

Биологическая активность ГВ интенсивно изучается в течение долгого времени. Наличие положительного ответа живых организмов на присутствие небольших доз гуминовых веществ в окружающей среде доказывают многочисленные исследования [3, 4]. Кроме того, ГВ могут выполнять и протекторную функцию, защищая живые организмы от воздействия различных токсикантов и ксенобиотиков [5]. В настоящее время одним из широко распространенных ксенобиотиков, загрязняющих экосистемы, является нефть и продукты ее переработки, которые попадают в окружающую среду при бурении, авариях транспортных средств, порывах нефтепроводов [6]. Очень остро стоит проблема разлива нефти в мировом океане и прибрежных земель.

При очистке почвенных и водных сред, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, широкое применение нашли методы биотехнологии, основанные на способности микроорганизмов использовать углеводороды нефти в качестве единственного источника углерода.

Деструкторами нефтяного загрязнения могут выступать микроорганизмы, сохранившиеся в загрязненной почве и воде, или специально вносимые микроорганизмы в виде биопрепарата культуры углеводородокисляющих микроорганизмов [7, 8].

Микроорганизмы-нефтедеструкторы, входящие в биопрепараты, должны уметь приспосабливаться к изменениям окружающей их среды, например, повышенной солёности, перепадам температур [9]. В совокупности с биопрепаратами культур углеводородокисляющих микроорганизмов применение гуминовых веществ дает положительный экологический эффект, который заключается в быстром восстановлении естественных биогеохимических процессов почв. Однако такие сложные по химическому строению вещества как ГВ обладают двойным эффектом и в определенных условиях оказывают негативное воздействие на живые организмы [3, 10].

Таким образом, целью данного исследования являлось установление влияния ГВ, выделенных из сфагнового переходного торфа (СПТ), на рост штамма-нефтедеструктора *Rhodococcus* sp. X5 при различных условиях культивирования (повышенной солёности среды и различных источниках углерода и энергии).

В данной работе изучали влияние ГВ СПТ на рост штамма *Rhodococcus* sp. X5, полученного из лаборатории биологии плазмид Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрбина РАН (г. Пущино). Бактерии входят в состав биопрепарата «МикроБак», применяемого для биоремедиации нефтезагрязненных территорий [9]. ГВ были выделены из сфагнового переходного торфа (СПТ). Данный торф был отобран на болоте Кочаки 2 у деревни Ясная поляна, Тульская область. Сфагновый переходный торф образован на сплаvine толщиной 1,5 м, которая плавает на поверхности карстового провала глубиной 7 м. Торф имеет низкую степень разложения 10–15 %, состоит из стеблей сфагновых мхов, остатков осок, пушицы и клюквы. Цвет торфа светло-коричневый.

ГВ выделяли методом щелочной экстракции, готовили рабочий раствор с концентрацией 1 г/л согласно работе [11]. *Rhodococcus* sp. X5 выращивали в богатой среде Лурия-Бертани (LB) и минеральной среде Эваса (Е) с добавлением гексадекана (2 %) как единственного источника углерода и энергии. Влияние ГВ на рост микроорганизма оценивали по изменению физиологических параметров роста (длительности фаз роста и максимальной удельной скорости роста), для этого проводили периодическое культивирования в качалочных колбах объемом 750 мл (объем среды – 100 мл). ГВ в культуральную среду добавляли до конечной концентрации 50 мг/л, NaCl – 3 %. Приготовленные среды стерилизовали автоклавированием при 121°C 40 мин. Культивирование проводили в шейкерах-инкубаторах при 28°C с аэрацией 180 об/мин. Для определения физиологических параметров роста снимали кривые роста, для чего стерильные среды заражали 1 мл инокулята (суточная культура, выращенная на среде Лурия-Бертани) и через определенные промежутки времени отбирали 3 мл и измеряли оптическую плотность культуральной среды на фотометре при длине волны 590 нм.

В результате работы были получены кривые роста *Rhodococcus* sp. X5 на средах с добавлением соли и ГВ СПТ (рис. 1). По полученным кривым роста были рассчитаны физиологические параметры роста (табл. 1).

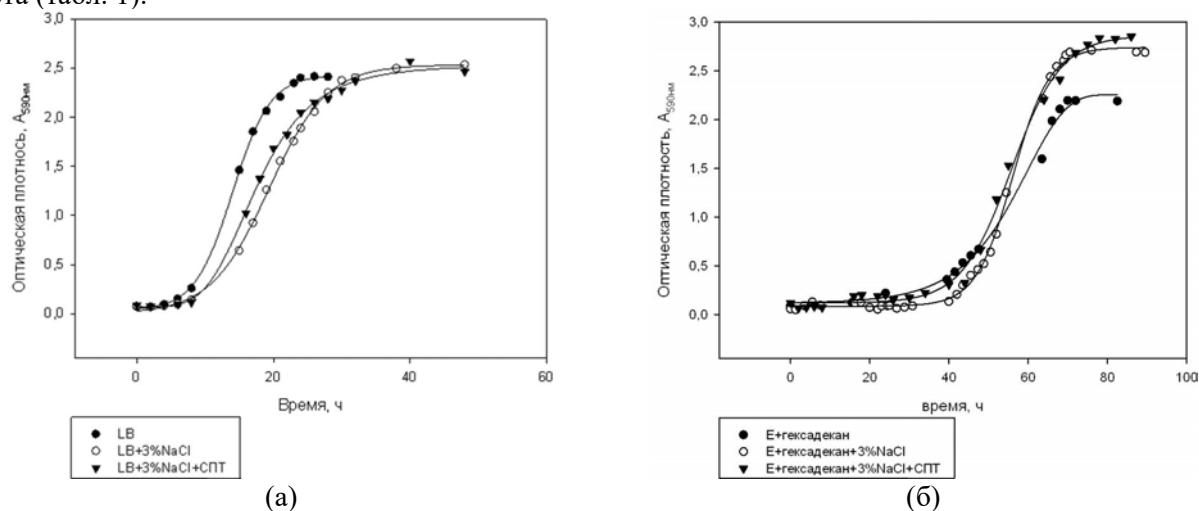


Рисунок 1. Кривые роста штамма *Rhodococcus* sp. X5 на средах с добавлением соли и гуминовых веществ сфагнового переходного торфа. (а) на богатой среде Лурия-Бертани (LB), (б) на минеральной среде Эванса (Е) с добавлением гексадекана (2 %), как единственного источника углерода и энергии

Таблица.1. Продолжительность периодов роста и максимальная удельная скорость роста *Rhodococcus sp. X5* при различных условиях культивирования

Физиологические параметры роста	среда LB			Среда Е с гексадеканом		
	Контроль	Добавление 3 % NaCl	Добавление 3 % NaCl и 50 мг/л ГВ СПТ	Контроль	Добавление 3 % NaCl	Добавление 3 % NaCl и 50 мг/л ГВ СПТ
Лаг-фаза	нет	нет	0–3 (3)	0–15 (15)	0–25 (25)	0–20 (20)
Ускорение роста, ч	0–4 (4)	нет	3–7 (4)	15–33 (18)	25–41 (16)	20–36 (16)
Экспоненциальная фаза, ч	4–13 (9)	0–13 (13)	7–13 (6)	33–60 (27)	41–55 (14)	36–53 (17)
Замедления роста, ч	13–20 (7)	13–30 (17)	13–32 (19)	60–70 (10)	55–65 (10)	53–65 (12)
Выход на стационарную фазу, ч	20	30	32	70	65	65
Максимальная удельная скорость роста, ч ⁻¹	0,270	0,221	0,280	0,067	0,141	0,099

Из таблицы видно, что при росте на богатой среде LB добавление соли замедляет рост культуры в 1,2 раза, а также увеличивает продолжительность фазы замедления роста и выход на стационарную фазу роста. Это говорит о том, что, несмотря на устойчивость данных микроорганизмов к наличию соли в культуральной среде, деление микроорганизмов постепенно замедляется и ресурсы клетки задействованы на защиту и выживание микробов в гиперосмотических условиях.

Наличие ГВ СПТ в концентрации 50 мг/л в среде не влияет на рост микроорганизмов, однако, при добавлении ГВ СПТ в среду, содержащую 3 % соли, приводит к ускорению роста в 1,3 раза по сравнению с ростом в среде с добавлением соли, и максимальная удельная скорость роста приближается к контрольному значению. Однако, как видно из таблицы 1, при наличии в среде ГВ появляется лаг-фаза, что говорит о приспособлении микроорганизмов к новым условиям среды. Кроме того, сокращается время экспоненциальной фазы роста и увеличивается стадия замедления роста, что свидетельствует о том, что среда с добавлением ГВ и соли с не является оптимальной для развития.

Данный факт можно объяснить формированием плотного полимолекулярного слоя, состоящего из молекул ГВ, сорбированного на поверхности и внутриклеточной стенки бактерий, который, с одной стороны, защищает клетку от воздействия осмотического давления, с другой стороны, препятствует нормальному обмену веществ между клеткой и питательным раствором и приводит к снижению роста [4, 12].

При росте на минеральной среде Эванса с гексадеканом как единственным источником углерода и энергии наблюдается другая картина. Добавление соли в культуральную среду приводит к увеличению максимальной удельной скорости роста в 2 раза. Что может говорить о более благоприятных для данной культуры условиях развития, несмотря на то, что время адаптации микробов к данной среде увеличивается в 1,5 раза. Возможно, в данных условиях поступление субстрата в клетку проходит более легко. Добавление ГВ в культуральную среду приводит к замедлению роста и снижению максимальной удельной скорости роста в 1,4 раза по сравнению со средой с добавлением соли, что так же может быть связано с образованием полимерного слоя на поверхности клеток и препятствию поступления субстрата.

Таким образом, по полученным результатам можно заключить, что ГВ СПТ обладают незначительными протекторными свойствами и в некоторых условиях замедляют развитие микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

- Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: МГУ, 1990. 325 с.
- Перминова И.В. Гуминовые вещества – вызов химикам XXI века // Химия и жизнь – XXI век. 2008. № 1. С. 50–55.
- Куликова Н.А. Защитное действие гуминовых веществ по отношению к растениям в водной и почвенной средах в условиях абиотических стрессов: автореф. дис... д-ра биол. наук. М., 2008. 48 с.
- Попов А.И. Гуминовые вещества: свойства, строение, образование/ Под ред. Е.И. Ермакова. СПб.: Изд-во С. – Петерб. ун-та, 2004. 248 с.
- Акатова Е.В., Дмитриева Е.Д., Сюндюкова К.В., Леонтьева М.М., Музафаров Е.Н. Детоксицирующая способность гуминовых веществ торфов различного происхождения по отношению к ионам тяжелых металлов // Химия растительного сырья. 2017 г. № 1. С. 119–127.

6. Шамраев А.В., Шорина Т.С. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды // ВЕСТНИК ОГУ. 2009. № 6. С. 642–645.
7. Рогозина Е.А., Тимергазина И.Ф., Моршуннов П.А. Очистка нефтезагрязненных почв бактериями рода *Pseudomonas* – основой биопрепаратов НАФТОКС 12-Р и НАФТОКС 48-У // Нефтегазовая геология. Теория и практика. 2014. Т.9. № 2. С. 1–16.
8. Назарько М.Д., Щербаков В.Г., Александрова А.В. Перспективы использования микроорганизмов для биodeградации нефтяных загрязнений почв // Известие вузов. Пищевая Технология. 2004. № 4. С. 89–91.
9. Биопрепарат для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами, способ его получения и применения: патент № 2378060 Российская Федерация / Филонов А.Е., Кошелева И.А., Самойленко В.А., Шкидченко А.Н., Нечаева И.А., Пунтус И.Ф., Гафаров А.Б., Якшина Т.В., Боронин А.М., Петриков К.В. – № 2378060; заявл. 2007–07–05; опубл. 10.01.2009. Бюл. № 1. – 15 с.
10. Дмитриева Е.Д., Платонов В.В., Проскуряков В.А., Сыпченко А.Я., Хадарцев А.А. Биологическая активность сапропеля и препаратов на его основе. Деп. В ВИНТИ 03.07.2003 – № 1262 В. 2003. 20 с.
11. Дмитриева Е.Д., Леонтьева М.М., Сюндюкова К.В., Молекулярно-массовое распределение гуминовых веществ и гиматомелановых кислот торфов различного генезиса Тульской области металлов // Химия растительного сырья. 2017. № 4. С. 187–194.
12. Овчинникова Т.Ф., Кудряшов А.П., Мажуль В.М., Наумова Г.В., Райцина Г.И. О мембранотропной активности гидрогумата – гуминового препарата из торфа // Научн. докл. высш. школы, Серия биол. науки. 1991. № 10. С. 103–109.