

10. Kupriyanova E., Villarejo A., Markelova A., Gerasimenko L., Zavarzin G., Samuelsson G., Los D.A., Pronina N. Extracellular carbonic anhydrases of the stromatolite-forming cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes* // Microbiology.- 2007.- V. 153.- P. 1149-1156.

11. Миходюк О.С., Заварзин Г.А., Ивановский Р.Н. Транспортные системы для карбоната у экстремально натронофильной цианобактерии *Euihalothece* sp. // Микробиология. - 2008. - Т. 77. - С. 465-471.

12. Kupriyanova E.V., Sinetova M.A., Markelova A.G., Allakhverdiev S.I., Los D.A., Pronina N.A. Extracellular β -class carbonic anhydrase of the alkaliphilic cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes* // J. Photochem. Photobiol. B: Biology.- 2011.- V. 103.- P. 78-86.

13. Raven J.A., Cockell C.S., De La Rocha C.L. The evolution of inorganic carbon concentrating mechanisms in photosynthesis // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.- 2008.- V. 363.- P. 2641-2650.

**Т.Д. Мукашева, Р.Ж. Бержанова, М.Х. Шигаева, Р.К. Сыдыкбекова,
Л.В. Игнатова, Д. Даутова, А.А. Сартаева**

СТАБИЛИЗАЦИЯ ПОПУЛЯЦИИ И СЕЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ - ДЕСТРУКТОРОВ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ

(Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г.Алматы)

*Проведена сравнительная оценка методов отбора активных вариантов у штамма *Rhodococcus equi* 51КС. Установлено, что для селекции вариантов с повышенной деструктивной активностью можно рекомендовать два метода – метод продленного культивирования в жидкой среде с ПАУ и метод продленного культивирования с постепенным возрастом ПАУ в среде.*

Подверженность микроорганизмов, применяемых в микробиологической промышленности, популяционным изменениям приводит к снижению их продуктивности и эффективности технологического процесса. Это вызывает необходимость проведения исследований по стабилизации популяции и отбору культур с высокой стабильной активностью.

К числу ценных в практическом отношении культур относятся углеводородоокисляющие микроорганизмы, способные утилизировать углеводороды. Важность отбора вариантов, обладающих высокими способностями к деструкции, представляет большой интерес с точки зрения создания полноценных и высококачественных препаратов для экобиотехнологических целей [1].

Использование новых селекционных подходов, направленных на повышение адаптивных возможностей и получение преимущественно полезных мутаций получило развитие сравнительно недавно. Традиционно для получения продуктивных штаммов микроорганизмов использовали индицированный мутагенез с последующим отбором полезных мутантов, который применяется до сих пор. В настоящее время применяют новые методы, основанные на технологии рекомбинантных ДНК (генетическая инженерия). Однако использование рекомбинантных штаммов микроорганизмов для экологических целей не целесообразно. Поэтому необходимо разрабатывать иные подходы для отбора высокоактивных вариантов у микроорганизмов - деструкторов. Одним из таких является использование методов, основанных на повышении адаптивных возможностей микроорганизмов-деструкторов.

При хранении промышленных штаммов микроорганизмов, помимо потери жизнеспособности клеток, наблюдается также процессы популяционной изменчивости. При этом доминантный фенотип замещается другими измененными исходными свойствами и продуктивной активностью, происходит потеря штаммами приоритетных свойств. Это обусловило необходимость проведения работ по разработке подходов повышения деструктивной активности микроорганизмов, входящих в состав препаратов для биоремедиации загрязненных экосистем после их хранения.

В этой связи были проведены исследования по разработке методических рекомендации для отбора перспективных микроорганизмов-деструкторов полициклических ароматических углеводородов.

Материал и методы

В работе использовали штамм *Rhodococcus equi* 51КС [3-4]. Рост микроорганизмов на твердых полициклических ароматических углеводородах изучали при выращивании микроорганизмов на агаризованной минеральной среде с добавлением ПАУ на поверхность питательной среды. Способность штаммов к трансформации полиароматических углеводородов изучали на агаризованной минеральной среде 8Е по методике [5]. Микроорганизмы выращивали на агаризованной минеральной среде на чашках Петри с нафталина (50 мг/л, 100 мг/л и 150 мг/л) и антрацена (25 мг/л, 50 мг/л и 100 мг/л). Углеводороды растворяли в хлороформе, равномерно распределяли по поверхности среды, затем наливали второй тонкий слой среды. Колонии микроорганизмов, способные использовать

углеводороды образовывали зоны просветления, не флуоресцирующие в ультрафиолетовых лучах поверхностного слоя углеводорода.

Определение стабильности признака роста на ПАУ. Стабильность признака биodeградации штаммов-деструкторов определяли после хранения штаммов в течение года при температуре 4 - 5°С в холодильнике. После хранения культур микроорганизмов, проводили активизацию способности к росту на среде, содержащей 7% Тенгизской нефти. Затем проверяли стабильность признака роста на нафталине и антраcene. Стабильность признака определяли следующим образом: бактериальную культуру выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ) при 28°С в течение 2 суток, после чего 0,1 мл бактериальной культуры вносили в 10 мл свежего МПБ для повторного выращивания. Процедуру повторяли 3-4 раза каждые 0, 3, 5 и 10 суток. На 3, 5, и 10 сутки роста из разведений делали высевы на чашки Петри с агаризованной средой (МПА) для получения изолированных колоний. Методом реплик сто отдельных колоний переносили на селективные чашки с нефтью. Стабильность признака определяли как процентное соотношение количества вариантов, сохранивших способность к росту на изучаемом субстрате, к общему числу проверенных вариантов.

Отбор вариантов, растущих при высоких концентрациях нафталина и антрацена. Культуру выращивали на питательной среде МПБ или на синтетической среде с нафталином и антраценом. Через 5-10 суток роста культуры высевали на твердые питательные среды. Культуру, выращенную в МПБ, высевали на МПА с целью получения отдельных вариантов. Произвольно взятые варианты, методом реплик пересекали на твердую питательную среду, содержащую различные концентрации нафталина (150 -1000 мг /г) и антрацена (100 - 500 мг/л). Варианты, обладающие способностью к росту на высоких концентрациях ПАУ, сохраняли в течение одного месяца, затем проверяли стабильность признака роста на высоких концентрациях нафталина и антрацена.

Метод накопительно-адаптационный. Штамм выращивали на МПА в пробирках. Суспензию клеток вносили в жидкую среду с нафталином (300 мг/л) или антраценом (150 мг/л). Полученную таким образом суспензию клеток переносили в жидкую среду с нафталином (500 мг/л) или антраценом (300 мг/л) и культивировали на качалке в течении 10 суток. Через 10 суток культивирования на качалке, производили высеv суспензии на МПА с целью получения отдельных колоний.

Метод продленного культивирования. Штамм выращивали на МПА в пробирках. Суспензию клеток вносили в жидкую среду с нафталином (300 мг/л) или антраценом (150 мг/л). Через 10 суток выращивания на качалке суспензию объемом 10 мл переносили в колбы с жидкой средой, содержащие нафталин (300 мг/л) или антрацен (150 мг/л) культивировали 10 суток. Через 10 суток еще раз суспензию переносили в колбы с жидкой средой, содержащие нафталин (300 мг/л) или антрацен (150 мг/л) культивировали 10 суток. Затем производили высеv суспензии на МПА с целью получения отдельных колоний.

Метод продленного культивирования постепенным возрастанием концентрации ПАУ. Штамм выращивали на МПА в пробирках. Суспензию клеток вносили в жидкую среду с нафталином (300 мг/л) или антраценом (150 мг/л). Через 10 суток выращивания на качалке суспензию объемом 10 мл переносили в колбы с жидкой средой, содержащие нафталин (400 мг/л) или антрацен (200 мг/л) культивировали 10 суток. Через 10 суток еще раз суспензию переносили в колбы с жидкой средой, содержащие нафталин (500 мг/л) или антрацен (300 мг/л) культивировали 10 суток. Затем производили высеv суспензии на МПА с целью получения отдельных колоний.

Произвольно взятые колонии, методом реплик пересекали на твердую питательную среду, содержащую различные концентрации нафталина (300 -1000 мг /г) и антрацена (200 - 500 мг/л). Колонии, обладающие способностью к росту на высоких концентрациях ПАУ, сохраняли в течение одного месяца или более 3 месяцев, затем проверяли стабильность признака роста на высоких концентрациях нафталина и антрацена.

Результаты и обсуждение

Разработка новых селекционных подходов, направленных на повышение адаптивных возможностей микроорганизмов-деструкторов получило развитие сравнительно недавно. Отбор вариантов с повышенной активностью у штаммов – деструкторов представляет собой задачу, специфичную для каждого конкретного случая. Так, при изучении естественной изменчивости можно провести стабилизирующий отбор активных вариантов у микроорганизмов - деструкторов. Однако в селекции микроорганизмов – деструкторов важна их адаптация к потреблению загрязнителя. Для отбора активных вариантов часто используют метод накопительных культур. Кроме того, еще в 1926 году для отбора деструкторов, усваивающих ароматические соединения, Доорен-де-Ионгом был применен метод продленного культивирования в присутствии в среде ксенобиотика [6]. Сейчас он

практически забыт, но в последние годы привлек внимание исследователей работающие с микроорганизмами, окисляющие углеводороды. Все эти подходы были использованы для получения вариантов с высокой деструктивной активностью у штамма *Mycobacterium thermoresistibile* 119-3ГМ [7-8]. С целью рекомендации метода по отбору вариантов с высокой деструктивной активностью были проведены такие же исследования со штаммом *Rhodococcus equi* 51КС, который также хорошо растет на различных ПАУ (таблица 1). Так, отобрано 789 вариантов у штамма *Rhodococcus equi* 51КС, полученных при использовании накопительно-адаптационного метода. Проверена их способность к росту при концентрации ПАУ от 200 до 1000 мг/л. Из 789 вариантов штамма *Rhodococcus equi* 51КС всего 25 вариантов росли на твердой среде с ПАУ, содержащие высокие концентрации.

Получены 908 вариантов штамма *Rhodococcus equi* 51КС при использовании метода продленного культивирования. Все варианты были проверены на способность к росту при концентрации ПАУ от 300 до 1000 мг/л.

Всего 13 вариантов росли на твердой среде с нафталином при концентрации 750 мг/л и 10 вариантов - 1000 мг/л, 15 вариантов росли на твердой среде с антраценом при концентрации 250 мг/л и 7 - 500 мг/л.

Отобрано 966 вариантов штамма *Rhodococcus equi* 51КС полученных при использовании метода продленного культивирования с постепенным возрастанием концентрации нафталина. Из них 13 вариантов росли на твердой среде с нафталином при концентрации 500 мг/л и 6 вариантов при 1000 мг/л. и 16 вариантов росли на твердой среде, содержащие высокие концентрации антрацена.

В таблице 2 представлены сведения о стабильности вариантов, отобранных при использовании трех методов штамма *Rhodococcus equi* 51КС, которые исследовались на протяжении трех пересевов. Не все отобранные варианты штамма *Rhodococcus equi* 51КС сохранили признак роста на высоких концентрациях ПАУ при последующих пересевах.

Наибольшее число вариантов, которые сохранили признак роста на средах с высоким содержанием ПАУ, были отобраны методами продленного культивирования и продленного культивирования с постепенным возрастанием ПАУ. Необходимо, отметить, что не все из отобранных вариантов штамма *Rhodococcus equi* 51КС сохранили признак роста на высоких концентрациях ПАУ при пересевах.

Таблица 1 - Рост вариантов на различных концентрациях нафталина штамма *Rhodococcus equi* 51КС

ПАУ в среде мг/л	Морфотип	Количество вариантов	Концентрация ПАУ в среде, мг/л							
			Количество вариантов (p<0,01)							
			нафталин							
			700	750	800	850	900	950	1000	
накопительно-адаптационный метод										
нафталин	1	787±7,3	25±1,3	23±0,3	12±0,2	7±0,2	5±0,2	5±0,2	2±0,2	
	2	2±0,2	2±0,2	-	-	-	-	-	-	
метод продленного культивирования										
нафталин	1	906±7,3	13±1,3	13±0,3	12±0,2	12±0,2	11±0,2	11±0,2	10±0,2	
	2	2±0,2	2±0,2	-	-	-	-	-	-	
метод продленного культивирования с постепенным возрастанием ПАУ										
нафталин	1	966±9,3	19±1,3	12±1,7	10±1,1	10±1,1	7±1,2	7±1,2	6±1,3	
	2	12±7,3	6±1,5	-	-	-	-	-	-	
антрацен										
			300	350	400	450	500			
накопительно-адаптационный метод										
антрацен	1	883±9,4	25±2,8	9±1,9	6±0,3	5±1,2	5±0,3			
	2	10±1,3	7±1,3	-	-	-	-			
метод продленного культивирования										
антрацен	1	784±6,3	15±1,3	13±1,6	11±1,3	11±1,5	7±0,9			
	2	5±1,1	3±0,3	-	-	-	-			
метод продленного культивирования с постепенным возрастанием ПАУ										
антрацен	1	874±7,3	13±2,8	11±1,8	10±0,8	8±0,9	6±0,8			
	2	4±0,3	3±0,5	-	-	-	-			

Наиболее количество вариантов, сохранивших способность к росту на высоких концентрациях ПАУ, были получены с использованием этих же методов. Эти данные совпадают с результатами, полученными на штамме *Mycobacterium thermoresistibile* 119-3ГМ.

Таблица 2 - Стабильность признака роста вариантов на нафталине и антрацене у отобранных вариантов штамма *Rhodococcus equi* 51КС.

Условия отбора вариантов	Количество проверенных вариантов	Пассажи					
		2		3		4	
		абс	%	абс	%	абс	%
накопительно-адаптационный метод							
нафталин	25	23	100	18	72,1	12	48,1
антрацен	15	100	100	12	71,0	5	33,3
метод продленного культивирования							
нафталин	23	23	100	20	86,3	12	56,1
антрацен	21	100	100	15	71,5	10	47,6
метод продленного культивирования с постепенным возрастанием ПАУ							
нафталин	19	19	100	17	82,6	12	53,1
антрацен	16	12	88,8	10	62,5	8	41,1

Экспериментальный анализ методов селекции микроорганизмов-деструкторов токсических поллютантов исследователями до сих пор не проводился. Отсутствуют также исследования по совершенствованию способов отбора вариантов с повышенной активностью у микроорганизмов-деструкторов полициклических ароматических углеводородов. Отбор устойчивых микроорганизмов к токсичному субстрату и способных к росту при высоких его концентрациях, возможно, облегчается при наличии в среде ксенобиотика. На основании полученных данных можно предположить, что отбор вариантов, способных к росту при более высоких концентрациях ксенобиотика можно проводить при выращивании их на селективных средах, где в качестве селективного фактора является загрязнитель. Таким образом, сравнительная оценка разных методов отбора вариантов, способных к росту на высоких концентрациях ПАУ показала, что наиболее перспективными являются два метода: продленного культивирования в жидкой среде с ПАУ и продленного культивирования в жидкой среде с постепенным возрастанием в ней ПАУ.

1 Margesin R., Labbe D., Schinner F., Greer C.W., Wryte L.G. Characterization of hydrocarbon-degrading microbial population in contaminated and pristine alpine soils // Appl. Environ. Microbiol. - 2010. - Vol.69, №6. - P. 3085-3092

3 Предпатент РК № 16968, МПК⁷ С 12 N 1/20. Штамм бактерии *Mycobacterium thermoresistibile* 119-3ГМ используемый для очистки почвы от нефти и нефтепродуктов / Шигаева М.Х., Мукашева Т.Д., Сыдыкбекова Р.К., Атемова Г.Т. - Опубл. 23.12.2004; Бюл. №1.

4 Мукашева Т.Д. Оценка деструктивной активности различных форм биопрепаратов из нефтеокисляющих микроорганизмов // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2007. - № 1 (31). – С. 75-81

5 Kiyohara H., Nagao K., Yana K. Rapid screen for bacteria degradation of water - insoluble solid hydrocarbons on agar plates // Appl. Environ. Microbiol. - 1982. - Vol. 43, № 1. - P. 454-457.

6 Скрыбин Г.К., Головлева Л.А. Использование микроорганизмов в органическом синтезе. М. «Наука», - 1976. 323 с.

7 Мукашева Т.Д. Изучение популяционной изменчивости углеводородокисляющего штамма *Mycobacterium thermoresistibile* 119- 3ГМ // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2010. - № 3. – С. 73-75.

Бейімденудің үш тәсілін *Rhodococcus equi* 51КС субстрат штамына пайдалану кезінде орта құрамында жоғарғы деңгейде нафталин және антрацен болғанда өсу қабілеті жақсы байқалады.

When you use three methods to adapt to the strain of *Rhodococcus equi* 51KS substrate selection options, as well as the ability to increase in environments with a high content of naphthalene and anthracene.