

РОЛЬ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ В ПРОЛОНГИРОВАНИИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ

© 2019 г. Ю. А. Николаев^{а, *}, Е. В. Демкина^а, И. В. Перминова^б, Н. Г. Лойко^а,
И. А. Борзенков^а, А. Е. Иванова^а, А. И. Константинов^б, Г. И. Эль-Регистан^а

^аФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

^бМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, Москва, 119234 Россия

*e-mail: nikolaeva@mail.ru

Поступила в редакцию 05.06.2019 г.

После доработки 11.07.2019 г.

Принята к публикации 29.07.2019 г.

Показано, что внесение гуминовых веществ (9 препаратов) в культуры углеводородокисляющих бактерий приводит к увеличению численности жизнеспособных клеток до 15 раз при хранении культур в среде роста при доступе кислорода при 20–25°C. Биологической активностью индукции образования персистеров, созревающих в покоящиеся формы, обладали наиболее окисленные гуматы, а активностью, направленной на сохранение жизнеспособности – неокисленные, с антиоксидантной активностью.

Ключевые слова: углеводородокисляющие бактерии, гуминовые вещества, персистеры, покоящиеся клетки, стресс, пролонгирование жизнеспособности

DOI: 10.1134/S0026365619060120

В настоящее время используется достаточно большое число технологий ликвидации нефтяных проливов (Sihag et al., 2014; Koshlaf, Ball, 2017), из которых применение микробиологических технологий наиболее предпочтительно для природных экосистем. При невысоком уровне загрязнений используют технологии активизации аборигенной микрофлоры агротехническими приемами. Другой подход, так называемая целевая биоремедиация, основан на внесении в загрязненную экосистему бакпрепаратов углеводородокисляющих микроорганизмов (Кузнецов и соавт., 2010). Наиболее часто бакпрепараты для биоремедиации выпускаются в форме паст, порошков или сгущенной биомассы клеток (Дагуров и соавт., 2005). Существенным недостатком всех бакпрепаратов является быстрая гибель микроорганизмов в процессе получения, хранения и транспортировки их товарных форм. В связи с этим повышение эффективности бакпрепаратов сопряжено, прежде всего, с продлением жизнеспособности микробных клеток.

Целью исследования было разработать новые подходы к пролонгированному сохранению жизнеспособности клеток углеводородокисляющих бактерий путем их стабилизации с помощью гуминовых веществ (ГВ).

Использование ГВ было обусловлено тем, что они представляют собой продукты конденсации и окисления фенольных соединений, в том числе алкилрезорцинов, в зависимости от концентрации проявляющих стресс-потенцирующую и антиоксидантную активность (Эль-Регистан и соавт., 2006; Николаев и соавт., 2006; Stasiuk, Kozubek, 2010). Одним из эффектов алкилрезорцинов является индукция стрессовых регулонов (Голод и соавт., 2009), что, в свою очередь, индуцирует образование субпопуляции клеток-персистеров (van den Bergh et al., 2017), обладающих высокой стрессоустойчивостью и, важно подчеркнуть – устойчивостью к автолизу (Balaban et al., 2013).

Объектами исследования были грамотрицательные бактерии *Acinetobacter junii* и *Pseudomonas extermaustralis* и грамположительная бактерия *Rhodococcus erythropolis* из коллекции культур микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН, способные к активному окислению углеводородов нефти и их утилизации в качестве единственного источника углерода и энергии.

Бактерии выращивали при 28 ± 2°C на орбитальной качалке (100 об./мин) в конических колбах объемом 250 мл, содержащих 50 мл жидкой минеральной среды К1 (Зайцев, Карасевич, 1981)

Таблица 1. Динамика изменения количества жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) *Acinetobacter junii* при длительном хранении контрольных и опытных культур с внесением препарата “Гумиком”

Длительность хранения, сут	Количество клеток (КОЕ/мл) в вариантах с добавлением ГВ, г/л					
	0 (контроль)	0.03	0.15	0.6	1.5	3.0
0	9.8×10^8					
1	7.6×10^8	7.7×10^8	9.6×10^8	8.9×10^8	8.7×10^8	8.6×10^8
7	2.3×10^8	2.4×10^8	2.8×10^8	5.3×10^8	4.0×10^8	3.8×10^8
14	5.6×10^7	7.0×10^7	7.7×10^7	1.3×10^8	9.6×10^7	9.0×10^7
30	6.9×10^6	1.5×10^7	4.8×10^7	7.8×10^7	5.4×10^7	4.8×10^7
60	4.0×10^6	6.4×10^6	7.6×10^6	8.6×10^6	1.2×10^7	9.5×10^6
90	2.7×10^6	3.1×10^6	4.0×10^6	5.1×10^6	7.5×10^6	6.1×10^6
120	8.2×10^5	9.3×10^5	1.2×10^6	2.0×10^6	3.5×10^6	2.8×10^6

Таблица 2. Структурно-групповой состав исследованных гуматов по данным спектроскопии ^{13}C ЯМР

Гумат	Распределение углерода по основным структурным фрагментам ГВ, %								
	СНп	СН ₃ О	СН ₂ О	СНО	ОСО	Сар	СарО	СОО	С=О
Гумат + 7	12.7	2.5	1.7	2.2	4.0	44.5	13.0	13.5	5.9
Гумиком	18.4	2.4	2.3	4.4	5.5	30.7	8.6	19.0	8.9
Сахалинский	11.4	1.5	1.3	3.6	4.5	41.8	10.5	19.4	6.0

или среды LB (“Sigma”). В качестве источника углерода для роста *A. junii* использовали пентадекан (10 мл/л). Инокулят — культуры стационарной фазы роста, вносили в количестве 2% (об.). О росте культур судили по изменению оптической плотности при $\lambda = 540$ нм (спектрофотометр Jenway 7315, Великобритания).

Число жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) определяли путем посева аликвот десятиричных разведений культур на агаризованную (1.8% агара, “Helicon”) питательную среду LB (“AMRESCO”).

В экспериментах использовали ряд ГВ различного химического состава и генезиса: гумат техноэкспорт (ГТ), фульвокислоты (ФК), пауэрхумус (РН), иркутский гумат (ГИ), лигногумат (ЛГ), гумат сахалинский (ГС), сапропелевый гумат (С), гумат +7 (Г7), гумат калия “гумиком” (Г) (химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова). Для некоторых ГВ химический состав был определен (табл. 2), для остальных эти данные будут получены и проанализированы в следующих публикациях.

Структурно-групповой состав препаратов ГВ определяли методом спектроскопии ЯМР ^{13}C в растворе на ЯМР-спектрометре Avance 400 (“Bruker”) с несущей частотой для ядер ^{13}C 100 МГц (Perminova et al., 1998, 2003). Условия получения количественных спектров ^{13}C ЯМР описаны в работе Ковалевский и соавт. (2000). Преобразование Фурье полу-

ченного спектра выполняли с использованием программного обеспечения MestReC одноименной компании. Интегрирование спектров для получения количественной информации о структурно-групповом составе гуматов выполняли с помощью программного обеспечения GelTreat, разработанного А.В. Кудрявцевым (химический факультет МГУ). Пределы интегрирования выбирали согласно (Hertkorn et al., 2002).

Статистическую и графическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Excel 2010.

В первой серии экспериментов было исследовано пролонгирование выживания популяций УОБ *A. junii*, выращенной на минеральной среде с пентадеканом, и определены механизмы действия 3-х препаратов ГВ (Г, Г7, С). Показано, что внесение ГВ (0.03–3.0 г/л) в бактериальную культуру стационарной фазы роста приводит к увеличению численности жизнеспособных клеток в 7–16 раз при хранении бакпрепаратов от 1 до 4 мес. в провокационных условиях (при доступе кислорода воздуха, в среде роста, при температуре 20–25°C). Определена концентрационная зависимость стимулирующего действия ГВ (табл. 1). Оптимальными были для ГВ: Г – 0.06 г/л; Г7 – 1.0 г/л; С – 0.4% об. Анализ динамики отмирания культур *A. junii* как контрольных, так и опытных (с Г) вариантов (табл. 1), выявил их бимодальность. За начальной фазой быстрого отмира-

ния (0.167 lg КОЕ/мл сут), характерного для автолиза регулярных стационарных клеток, следовала фаза медленного отмирания (lg 0.015 КОЕ/мл сут), свойственная клеткам-персистерам, что ранее было показано для условно-патогенных бактерий как признак, детерминирующий этот тип фенотипической гетерогенности бактериальных популяций (Lewis, 2010). Субпопуляция быстро отмирающих клеток (до 30 сут) составляла около 99%, а численность выживших — около 1%, что соответствует численности персистеров в популяциях патогенных бактерий (Balaban et al., 2004, 2013).

Влияние ГВ на титр устойчивых к автолизу клеток-персистеров зависело от концентрации ГВ и сроков хранения культур. В табл. 1 представлены данные для препарата Г, для остальных ГВ выявлена аналогичная зависимость (наличие тех же фаз кривой отмирания). Наиболее выраженный эффект ГВ наблюдался через 1 мес. хранения, когда разница между контрольным и опытными вариантами составляла для разных препаратов ГВ от 400 до 1600%. На более поздних сроках инкубации (2–4 мес.) эта разница сокращалась, однако абсолютное количество выживших через 4 мес. клеток в опытных вариантах было существенно (на 500–700%) больше, чем в контрольных.

При сравнении биологической эффективности препаратов ГВ разного состава отмечены различия в их влиянии на численность образовавшихся клеток-персистеров. При краткосрочном хранении в провокационных условиях высокий титр КОЕ обусловлен наличием клеток-персистеров (1 мес. инкубации), на этот показатель в наибольшей степени влиял препарат ГВ “Г”. При пролонгированных сроках инкубации (4 мес.) выживали только покоящиеся клетки, и наибольший эффект отмечен для ГВ “Г7” и “С”, что коррелировало с их химическим составом (табл. 2). Препараты “Г” отличался большим количеством алкильных групп, высоким содержанием алкоксигрупп, карбоксильных и карбонильных групп, низким содержанием ароматического углерода, как замещенного, так и не замещенного гетероатомами. Такие свойства характерны для более окисленных ГВ. Препараты “Г7” и “С”, напротив, имели существенно меньшее число алкильных групп, высокое содержание ароматического углерода и низкое содержание карбонильных групп, что характеризует их как более восстановленные. Анализ полученных результатов позволил заключить, что стресс-индуцирующая активность, ответственная за образование в стационарных культурах клеток-персистеров, ассоциирована с окисленными гуматами, а продление сохранения колониеобразующей способности клеток определяется вкладом менее окисленных компонентов, обладающих более высокой антиоксидантной активностью.

Таким образом, эффекты действия ГВ на бактериальную популяцию стационарной фазы роста заключаются в: 1) индукции (повышении численности) образования длительно выживающих клеток-персистеров; 2) пролонгации сохранения их жизнеспособности в провокационных условиях хранения за счет их антиоксидантного действия.

Вторая часть исследования посвящена изучению влияния ГВ на стабилизацию вегетативных клеток углеводородокисляющих бактерий (УОБ). В отличие от предыдущего способа повышения численности жизнеспособных клеток за счет индукции образования персистеров, стабилизации подвергали вегетативные клетки УОБ конца фазы линейного роста, в которых не экспрессированы регулоны стрессоустойчивости (Ткаченко, 2018). Бактерии культивировали в богатой среде LB. В экспериментах с УОБ *R. erythropolis* и *P. extremaustralis*, различающихся строением клеточных стенок исследовали стабилизирующую активность 9 препаратов ГВ (ГТ, ФК, РН, ГИ, ЛГ, ГС, С, Г7, Г). ГВ вносили в культуры УОБ в концентрациях: 0.15, 0.5 и 1.5 г/л, культуры хранили в провокационных условиях. Через 1 мес. хранения титр жизнеспособных клеток в опытных культурах с ГВ был выше, чем в контрольных культурах в 3–10 раз (рис. 1). Стабилизация зависела от состава ГВ и их концентрации и была отмечена для всех ГВ, кроме гумата Г (рис. 1). Выраженным стабилизирующим действием на клетки грамположительного *R. erythropolis* обладали при минимальной концентрации 0.15 г/л гуматы препаратов ГИ, ГТ, ЛГ, РН (титр КОЕ был в 10, 5, 5, 10 раз больше, чем в контроле, соответственно). В случае грамотрицательной УОБ *P. extremaustralis* стабилизирующее действие ГВ было выражено слабее, увеличение титра КОЕ отмечено для гуматов ГС, Г, ЛГ при средних концентрациях 0.5 г/л, а также для РН при минимальной концентрации (титр КОЕ был больше, чем в контроле, в 10, 6, 4, 5 раз соответственно).

Таким образом, в результате проведенных исследований предложен новый подход к повышению количества жизнеспособных клеток в длительно хранящихся популяциях (культурах) УОБ, основанный на применении препаратов гуминовых веществ (ГВ). Показано, что внесение ГВ в бактериальную культуру стационарной фазы роста индуцирует образование устойчивых к автолизу клеток-персистеров, созревающих в стрессоустойчивые покоящиеся формы, что приводит к увеличению численности жизнеспособных клеток (в 7–16 раз) при хранении бакпрепаратов от 1 до 4 мес. в провокационных условиях (при доступе кислорода воздуха, в среде роста, при температуре 20–25°C). Второй способ основан на стабилизации гуматами вегетативных клеток бактерий, что повышает численность выживающих клеток в течение 1 мес. до 10 раз. Для

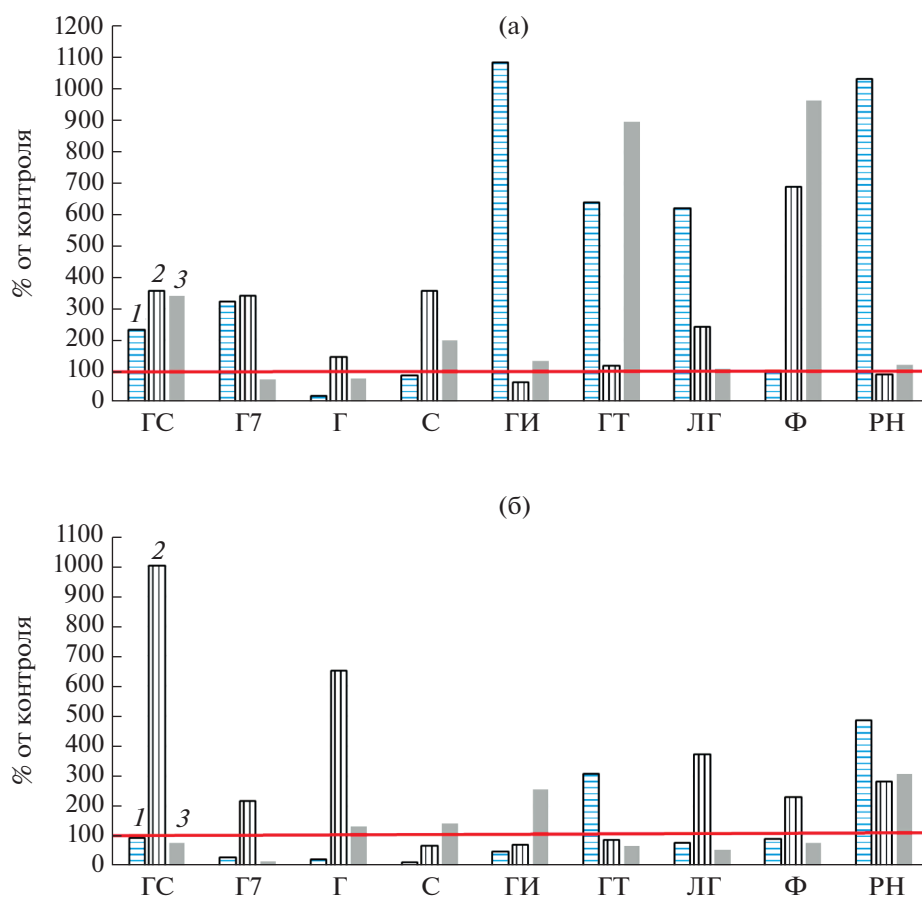


Рис. 1. Количество жизнеспособных клеток *R. erythropolis* (а) и *P. extremaustralis* (б) через 1 мес. инкубации с разными концентрациями ГВ (г/л): 1 – 0.15; 2 – 0.5; 3 – 1.5, по сравнению с контролем без ГВ (100%, отмечено горизонтальной линией).

каждой пары “микроорганизм–гумат” требуется оптимизация концентрации определенного ГВ.

Полученные результаты важны для технологического производства бакпрепаратов различного назначения, в том числе для пищевой промышленности в секторе производства молочнокислой продукции, где остро стоит вопрос повышения численности жизнеспособных клеток.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-29-05009 мк и частично – из средств Министерства науки и высшего образования РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Голод Н.А., Лойко Н.Г., Лобанов К.В., Миронов А.С., Вои́кова Т.А., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Роль микробных ауторегуляторов – алкилоксибензолов, в контроле экспрессии стрессовых регулонов // Микробиология. 2009. Т. 78. № 6. С. 731–741.
- Golod N.A., Loiko N.G., Lobanov K.V., Mironov A.S., Voieikova T.A., Gal'chenko V.F., Nikolaev Yu.A., El'-Registan G.I. Involvement of alkylhydroxybenzenes, microbial autoregulators, in controlling the expression of stress regulons // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 678–688.
- Дагуров А.В., Стом Д.И., Вятчина О.Ф., Балаян А.Э., Кушнарев Д.Ф. О механизме антидотного действия гуматов по отношению к нефтепродуктам // Acta Biomedica Scientifica. 2005. Т. 6. № 44. С. 143–145.
- Зайцев Г.М., Карасевич Ю.Н. Утилизация 4-хлорбензойной кислоты штаммом *Arthrobacter globiformis* // Микробиология. 1981. Т. 50. № 1. С. 35–40.

- Zaitcev G.M., Karasevich Yu.N. Utilization of 4-chlorobenzoic acid by *Arthrobacter globiformis* // *Microbiology (Moscow)*. 1981. V. 50. P. 35–40.
- Ковалевский Д.В., Пермин А.Б., Перминова И.В., Петросян В.С. Выбор условий регистрации количественных ¹³C ЯМР-спектров гумусовых кислот // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. 2000. Т. 41. № 1. С. 39–42.
- Кузнецов А.Е., Градова Н.Б., Лушников С.В., Энгельхарт М., Вайссер Т., Чеботаева М.В. Прикладная экобиотехнология. М., Бином, 2010. Т. 1. С. 472–620.
- Николаев Ю.А., Мулюкин А.Л., Степаненко И.Ю., Эль-Регистан Г.И. Ауторегуляция стрессового ответа микроорганизмов // *Микробиология*. 2006. Т. 75. № 4. С. 489–496.
- Nikolaev Yu.A., Mulyukin A.L., Stepanenko I.Yu., El'-Registan G.I. Autoregulation of stress response in microorganisms // *Microbiology (Moscow)*. 2006. V. 75. P. 420–426.
- Ткаченко А.Г. Молекулярные механизмы стрессорных ответов у микроорганизмов. Екатеринбург. УрО РАН, 2012. 268 с.
- Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // *Микробиология*. 2006. Т. 75. № 4. С. 446–456.
- El-Registan G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Yu.A., Suzina N.E., Gal'chenko V.F., Duda V.I. Adaptogenic functions of extracellular autoregulators of microorganisms // *Microbiology (Moscow)*. 2006. V. 75. P. 380–389.
- Balaban N.Q., Gerdes K., Lewis K., McKinney J.D. A problem of persistence: still more questions than answers? // *Nature Rev. Microbiol.* 2013. V. 11. P. 587–591.
- Balaban N.Q., Merrin J., Chait R., Kowalik L., Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch // *Science*. 2004. V. 305. P. 1622–1625.
- Hertkorn N., Permin A.B., Perminova I.V., Kovalevskii D.V., Yudov M.V., Kettrup A. Comparative analysis of partial structures of a peat humic and fulvic acid using one and two dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy // *J. Environ. Qual.* 2002. V. 31. P. 375–387.
- Koshlaf E., Ball A.S. Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments // *AIMS Microbiol.* 2017. V. 3. P. 25–49.
- Levin-Reisman I., Braunera A., Ronina I., Balaban N.Q. Epistasis between antibiotic tolerance, persistence and resistance mutations // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019. July 1. pii: 201906169. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906169116>
- Lewis K. Persister cells // *Annu. Rev. Microbiol.* 2010. V. 64. P. 357–372.
- Perminova I.V., Frimmel F.H., Kovalevskii D.V., Abbt-Braun G., Kudryavtsev A.V., Hesse S. Development of a predictive model for calculation of molecular weight of humic substances // *Wat. Res.* 1998. V. 32. P. 872–881.
- Perminova I.V., Frimmel F.H., Kudryavtsev A.V., Kulikova N.A., Abbt-Braun G., Hesse S., Petrosyan V.S. Molecular weight characteristics of aquatic, soil, and peat humic substances as determined by size exclusion chromatography and their statistical evaluation // *Environ. Sci. Technol.* 2003. V. 37. P. 2477–2485.
- Sihag S., Pathak H., Jaroli D. Factors affecting the rate of biodegradation of polyaromatic hydrocarbons // *Int. J. Pure Appl. Biosci.* 2014. V. 2. P. 185–202.
- Stasiuk M., Kozubek A. Biological activity of phenolic lipids // *Cell. Mol. Life Sci.* 2010. V. 67. P. 841–860.
- Van den Bergh B., Fauvart M., Michiels J. Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters // *FEMS Microbiol. Rev.* 2017. V. 41. P. 219–251.

Role of Humic Compounds in Viability Prolongation of the Cells of Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria

Yu. A. Nikolaev^{1, *}, E. V. Demkina¹, I. V. Perminova², N. G. Loiko¹, I. A. Borzenkov¹, A. E. Ivanona¹, A. I. Konstantinov², and G. I. El'-Registan¹

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Chemical Faculty, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: nikolaevya@mail.ru

Received June 5, 2019; revised July 11, 2019; accepted July 29, 2019

Abstract—Addition of humic compounds (9 preparations) to the cultures of hydrocarbon-oxidizing bacteria was shown to result in up to 15-fold increase in the number of viable cells in the cultures stored in the growth media with access to air at 20–25°C. The most oxidized humates exhibited the highest activity in induction of persister formation, which subsequently matured to dormant forms, while unoxidized humates with anti-oxidant activity supported viability persistence.

Keywords: hydrocarbon-oxidizing bacteria, humic compounds, persisters, dormant cells, stress, viability prolongation