

2. *Reiter R. J., Tan D.-X., Mayo J. C. et al.* Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathological implications in humans // *Acta Biochimica Polonica*. 2003. Vol. 50. № 4. P. 1129–1146.
3. *Semak I., Korik E., Antonova M. et al.* Metabolism of melatonin by cytochrome P-450s in rat liver mitochondria and microsomes // *J. Pineal Res.* 2008. Vol. 45, № 4. P. 515–523.
4. *Ferry G., Ubeaud C., Lambert P.-H. et al.* Molecular evidence that melatonin is enzymatically oxidized in a different manner than tryptophan: investigations with both indoleamine 2,3-dioxygenase and myeloperoxidase // *Biochem. J.* 2005. Vol. 388. P. 205–215.
5. *Tesoriere L., Avellone G., Ceraulo L. et al.* Oxidation of melatonin by oxoferryl hemoglobin: a mechanistic study // *Free Radical Research*. 2001. Vol. 35. P. 633–642.
6. *Ximenes V. F., Fernandes J. R., Bueno V. B. et al.* The effect of pH on horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of melatonin: production of N<sup>1</sup>-acetyl-N<sup>2</sup>-formyl-5-methoxykynuramine versus radical-mediated degradation // *J. Pineal. Res.* 2007. Vol. 42, № 3. P. 291–296.
7. *Рогожин В. В.* Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. Санкт-Петербург. 2004.
8. *Шумаев К. Б., Петров Н. Э., Заббарова И. В. и др.* Взаимодействие оксоферрилмиоглобина и динитрозильных комплексов железа // *Биохимия*. 2004. Т. 69. № 5. С. 699–705.

## **ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЬЮ И НЕФТЕПРОДУКТАМИ**

**М. И. Чернявская**

Загрязнение окружающей среды нефтью и продуктами ее переработки является актуальной экологической проблемой. Попадая в почвенные или водные экосистемы в результате переработки, добычи и транспортировки, нефть приводит к необратимому нарушению природных биоценозов, угнетая процессы жизнедеятельности всех живых организмов. Очистка от этого сложного химического соединения требует значительных затрат связанных с использованием большого арсенала физических и химических методов, которые зачастую влекут за собой возникновение новых не менее опасных источников загрязнения. Общеизвестно, что основную роль в круговороте веществ в природе играют микроорганизмы, способные деградировать практически все известные соединения природного и антропогенного происхождения. В этом плане особый интерес представляют природные микробные сообщества сформировавшиеся в условиях высокого загрязнения нефтью и продуктами ее переработки, изучение которых позволит понять принцип их формирования и использовать его для разработки экологически безопасных технологий очистки окружающей среды от опасных поллютантов.

Целью настоящей работы являлось выделение консорциумов микроорганизмов из загрязненных почв Ливии, Ирака и Беларуси и первичная характеристика входящих в него бактерий, способных деградировать нефть и продукты ее переработки.

Присутствие бактерий, способных утилизировать нефть фиксировали на основании исчезновения нефтяной пленки на поверхности воды, добавленных к почвенным образцам. В результате из 43 проанализированных, было отобрано 13 образцов почвы предположительно содержащих бактерии-деструкторы. Среди отобранных, 10 проб было изолировано на территории Ливии, 1 – на территории Ирака и 2 – на территории Беларуси.

Выделение бактериальных консорциумов из загрязненной почвы проводили в жидкой полноценной питательной среде. Для этого 1 навеску (1 г) почвенного образца помещали в колбу (50 мл), добавляли 10 мл жидкой полноценной питательной среды, культивировали с аэрацией (100 – 200 об./мин) при 28°C в течение 24 ч. Готовили серию разведений и производили высеивание на полноценный рыбный агар. Отбор штаммов проводили по морфологическим критериям. Для получения чистых линий изолированные клоны пассировались дважды на полноценной среде. Всего таким образом было отобрано 120 морфологически отличающихся штаммов. В частности, в почвенных образцах, отобранных на территории Ливии выявлено от 4 до 16 штаммов, в почвенном изоляте из Ирака – 9 штаммов, а из Беларуси – соответственно 7 и 5 штаммов.

Выделенные микроорганизмы культивировали на плотной или в жидкой минеральной среде М9 (1 часть солевого концентрата М9 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 24 г/л;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 12 г/л;  $\text{NaCl}$  – 2 г/л;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 4 г/л), 3 части 2 % водного агара, 1 % - 0,1 М  $\text{MgSO}_4$ , 1% - 0,1 М  $\text{CaCl}_2$ ) [1]. Способность к деградации нефти оценивали визуально (по формированию биомассы на плотной среде или разрушению нефтяной пленки - в жидкой). В результате из 120 проанализированных было отобрано 46 бактерий-деструкторов (39 %), способных использовать сырую нефть в качестве единственного источника углерода. Следует отметить, что природные консорциумы микроорганизмов, изолированные из почв Ливии и Ирака, содержали до 75 % бактерий-деструкторов нефти, что может являться следствием их формирования в условиях длительного и постоянного загрязнения, в результате которого сформировались достаточно представительные микробные консорциумы, существование которых обеспечивалось деградативной способностью многих членов входящих в их состав.

Для первичной характеристики отобранных деструкторов проводили окрашивание по методу Грама [2]. Большинство (35 из 46) отобранных

штаммов оказались грамположительными, причем 14 из них формировали на плотной полноценной среде пигментированные (розовые, желто-оранжевые) колонии. Из 9 грамотрицательных штаммов 4 продуцировали флуоресцирующие пигменты на среде Кинг В (пептон ферментативный – 20 г/л,  $K_2HPO_4$  – 1,5 г/л или  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  – 1,96 г/л, агар – 15 г/л, pH 7,0; после стерилизации добавляли 1 % глицерина, 0,15 %  $MgSO_4$ ) [3].

Исследование физиологических диапазонов роста (pH, температура, содержание NaCl в среде) проводили на полноценной питательной среде с соответствующими значениями pH (от 5,0 до 12,0) или концентрациями NaCl (от 1 до 20 %). Большинство штаммов были способны к росту при температуре 28 – 37 °С, многие штаммы росли также при температурах 18 и 42 °С. Выявлено, что один штамм, выделенный из иракского почвенного образца, способен к росту при 4 °С, а другой штамм (из того же источника) – при 54 °С. Самыми солеустойчивыми оказались также иракские штаммы, два из которых были способны расти при концентрации NaCl в среде равной 14 %. Следует отметить, что 50 % штаммов росли при концентрации NaCl 7 %. Все изученные штаммы росли при pH 7,0, для большинства было характерно наличие роста в более щелочной среде (pH 8,0 – 44 штамма), тогда как на более кислой среде росло меньшее количество штаммов (pH 6,0 – 24). Наиболее широким диапазоном pH характеризовались три штамма, выделенных из почв Ливии (диапазон pH 5,0 – 12,0).

Способность использовать отдельные компоненты нефти в качестве единственного источника углерода определяли по формированию колоний на плотной минеральной среде М9 с добавлением отдельного углеводорода. В качестве единственного источника углерода использовали гексадекан (0,1 %), фенантрен (0,02 %); нафталин, антрацен, толуол и *o*-ксилол (пары). Инкубировали в термостате (28 °С) в течение 7 суток. Учитывали результаты по системе «+» (наличие роста) и «-» (отсутствие роста). Из 46 исследованных штаммов 43 были способны использовать в качестве единственного источника углерода и энергии гексадекан, 7 – нафталин, 3 – толуол, 3 – *o*-ксилол, 1 – фенантрен, 1 – антрацен. Причем один из выделенных штаммов был способен к использованию всех исследованных углеводородов.

Наличие генетических детерминант, определяющих способность бактерий утилизировать отдельные компоненты нефти, определялось с помощью специфических праймеров. Были использованы 3 пары праймеров, позволяющие определить наличие в геноме таких генетических детерминант, как *alk1* (утилизация короткоцепочечных углеводородов; праймеры ALK-FI 5'-CAT AAT AAA GGG CAT CAC CG-3' и ALK-RI 5'-

GAT TTC ATT CTC GAA ACT CC-3'), alk3 (утилизация углеводов с различной длиной цепи, праймеры ALK-FIII 5'-TCG AGC ACA TCC GCG GCC-3' и ALK-RIII 5'- GTA GTG CTC GAC GTA GTT CG-3') [4], nahAc (утилизация полициклических ароматических углеводов, праймеры Ac149f 5'-CCC YGG CGA CTA TGT-3' и Ac1014r 5'-CTC RGG CAT GTC TTT TTC-3') [5]. Было выявлено 4 штамма, обладающих детерминантой alk1, 11 штаммов - alk3, 1 штамм – nahAc.

На основании всех проведенных исследований было отобрано 13 штаммов, которые можно рассматривать в качестве перспективных деструкторов нефти и нефтепродуктов.

### Литература

1. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976. С. 236
2. *Егоров Н. С.* Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М., 1995. С. 95
3. *King E. O. Ward M. K. Raney D. E.* Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. // J. Lab. and Clin Med, 1954. V. 44. P. 301-307
4. *Kohno T., Sugimoto Y., Sei K., Mori K.* Design of PCR primers and gene probes for general detection of alkane-degrading bacteria // Microb. Environ. 2002. V. 17. P. 114–121.
5. *Ferrero M., Llobet-Brossa E., Lalucat L., Garsia-Valdes E., Rosselo-Mora R.A., Bosch R.* Coexistence of two distinct copies of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas* strains isolated from the western Mediterranean region // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. P. 957–962.

## ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ И МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КРОТА ЕВРОПЕЙСКОГО (*TALPA EUROPAEA*)

### Е. В. Шамшур

Крот европейский (*Talpa europaea*) широко распространен и в отдельных районах является массовым видом [1, с. 44]. Он имеет большое значение в зооценозах, так как оказывает значительное влияние на формирование почвенной фауны не только косвенно, но и через изменение отдельных ее параметров. Кроме того, крот является хозяином многих экто- и эндопаразитов, которые служат переносчиками и возбудителями опасных инфекционных заболеваний не только животных, но и человека. Некоторый вред причиняет крот огородам, полям, лесным и плодовым питомникам: не употребляя растительной пищи, но, роясь не глубоко от поверхности почвы, он нарушает корневую систему растений.

Однако надо отметить и полезные стороны этого вида: он дает красивую и прочную шкурку, уничтожает большое количество почвенных насекомых и их личинок.