УДК 561.23

С.Ф. Шәйхелова,
Г.Ф. Фахруллина,
Л.Р. Нигәмәтҗанова,
Р.Ф. Фахруллин

КАРАМАЙ ТАРКАТУЧЫ *ALCANIVORAX BORKUMENSIS* БАКТЕРИЯЛӘРЕ ҺӘМ *TURBATRIX ACETI* СУАЛЧАННАРЫНЫҢ «ХУҖА – МИКРОФЛОРА» СИСТЕМАСЫНДАГЫ МӨНӘСӘБӘТЛӘРЕ

Разливы нефтепродуктов представляют серьёзную экологическую угрозу для водных и наземных экосистем. Биоремедиация, основанная на использовании нефтеразлагающих бактерий, является многообещающим способом очистки почв, загрязнённых углеводородами нефти. Было обнаружено, что свободноживущие нематоды *Turbatrix aceti* выживают в среде с сырой нефтью без бактериальной пищи, хотя развитие животных замедляется на 48 часов. В организме нематод нефть локализуется исключительно в кишечнике, не оказывая негативное воздействие на процесс дефекации. В роли колонизаторов кишечника нематод выступали углеводородокисляющие бактерии *Alcanivorax borkumensis.* Бактерии-нефтедеструкторы эффективно колонизируют кишечник, и нематоды демонстрируют те же показатели развития и фертильности, что и нематоды, которых культивировали с использованием стандартной бактериальной пищи *Escherichia coli*. Эффективность колонизации *A. borkumensis* (23 КОЕ/нематода) была почти в три раза выше, чем для *E. coli* (23 КОЕ/нематода). Важно отметить, что плодовитость нематод *T. aceti*, которые питались бактериями *A. borkumensis*, была почти такой же, как и у животных, которых кормили E. coli (~ 15 яиц/нематода). Вероятно, что нефтеокисляющие бактерии, колонизирующие кишечник, способствуют разложению проглоченной нефти, тем самым повышая шансы нематод на выживание в неблагоприятных условиях окружающей среды. Искусственная колонизация нематод *Turbatrix aceti* углеводородокисляющими микроорганизмами будет способствовать распространению бактерий в контаминированных нефтью почвах, что в свою очередь может стать потенциальным способом ликвидации разливов нефти.

Ключевые слова: бактерии-нефтедеструкторы, *Alcanivorax borkumensis*, нематоды, *Turbatrix aceti*, хозяин-микрофлора, биоремедиация.

The environmental hazards of oil spills are among the most serious environmental threats. Bioremediation based on using oil-degrading bacteria is a promising approach to tackle oil spills in soil. We found that *Turbatrix aceti* survive on pure crude oil diet, although the development of the animals is retarded for 48 h. Oil was detected exclusively within the intestines, without any adverse effects of defecation. We used of *Alcanivorax borkumensis* hydrocarbonoclastic bacteria for colonisation of *T. aceti* nematodes intestines.

Oil-degrading bacteria effectively colonise the intestines of the nematodes, which demonstrate the same development and fertility rates, as those fed with Escherichia

coli, a normal bacterial food. Colonisation efficiency for *A. borkumensis* (23 CFU per worm) was almost three times higher that for *E. coli* (23 CFU per worm). Importantly, the fertility in the T. aceti worms fed with *A. borkumensis* was nearly the same as in animals fed with *E. coli (~ 15 eggs per worm).* It is likely that the hydrocarbonoclastic bacteria colonising the intestines facilitate the ingested oil degradation, thus providing the nematodes better chances to survive in harsh environment. Artificial colonisation of *Turbatrix aceti* nematodes with oil-degrading microorganisms will promote microbial distribution in contaminated soils, thus finding potential applications for oil spills remediation.

Keywords: oil-degrading bacteria, *Alcanivorax borkumensis*, nematodes, *Turbatrix aceti*, host-microflora, bioremediation

Карамай зур әһәмияткә ия чимал һәм энергия чыганагы булуы белән беррәттән, әйләнә-тирә һәм андагы тереклек ияләренә куркыныч та тудыра. Туфрак тирәлеге карамай һәм карамай продуктлары белән пычранган вакытта, табигый биоценозлар бозыла, туфракның агрохимик һәм агрофизик үзлекләре начарая, шулай ук аның микробиологик сыйфатнамәләре дә үзгәрә. Моннан тыш, авыл хуҗалыгы үсемлекләренең уңышы да кими, чөнки туфрак пычрануларны җыеп, сеңдереп барырга сәләтле [Третьякова, 2018].

Карамай һәм карамай продуктлары белән пычранган тирәлекләрне физик һәм химик ысуллар ярдәмендә чистарту бик күп этаплардан тора, андый ысулларның чыгымнары да шактый югары була. Шуңа күрә бу очракта биологик чистартуның биотехнология ысуллары иң өметле ысуллардан санала. Әлеге ысуллар бердәнбер энергия чыганагы буларак һидрокарбоннарны кулланучы микробларның актив катнашуына нигезләнгән. *Alcanivorax borkumensis* исемле бактерияләр һидрокарбоннарны таркатучы микробларның әһәмиятле төркемен тәшкил итәләр. Карамай белән пычранган диңгез тирәлекләрендә әлеге бактерияләр иң күп күләмдә очрыйлар [Golyshin *et al.,* 2003].

Бүгенге көндә карамай белән пычранган тирәлекләрне биоремедиацияләүне тагын да нәтиҗәлерәк итү максатыннан, карамай таркатырга сәләтле микроблар һәм азык чылбырында югарырак урынны алып торучы организмнан торган өлге системалар булдырыла [Cuny *et al.,* 2007]. Бу очракта суалчаннар нәкъ шушы организм сыйфатында кулланыла ала: беренчедән, алар карамай белән пычранган тирәлектәге микробларның үрчүенә булышлык итә, икенчедән, суалчаннар туфрак тирәлегенә хас булган микроб берләшмәләренең төрлелеген көйләүдә зур әһәмияткә ия [Zhou *et al.,* 2019]. Югарыда тасвирланган өлге система әйләнә-тирәне торгызу барышын тизләтүче биотехнология стратегиясенә әйләнергә мөмкин. Тәҗрибәләр барышында кулланылган *A. borkumensis* диңгез бактерияләре һәм туфракта тереклек итүче *Turbatrix aceti* суалчаннары арасындагы табигый булмаган бәйләнеш моңа кадәр өйрәнелмәгән иде, шуңа күрә әлеге фәнни эшнең максаты булып *A. borkumensis* бактерияләренең *T. aceti* суалчаннарының физиологиясенә

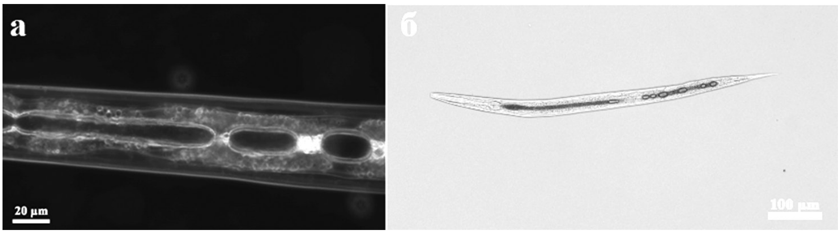
ясаган тәэсирен «хуҗа – микрофлора» системасы нигезендә өйрәнү билгеләнде.

Яшьләре бертөрле булган суалчаннарны үрчетү түбәндәгечә башкарылды: бер төркем суалчаннар, азык чыганагы сыйфатында *A. borkumensis* бактерияләрен кулланып, – *Nematode Growth Medium* туклыклы тирәлегендә, (1 нче номерлы тирәлек), икенче төркем – карамайлы тирәлектә (2 нче номерлы тирәлек), өченче төркем суалчаннар карамай таркатырга сәләтле бактерияләр кушылган карамайлы тирәлектә (3 нче номерлы тирәлек) үрчетелделәр (1 нче рәсем).

1 нче рәсем. Өч төрле тирәлектә үрчетелгән суалчаннарның оптик микросурәтләре:
а) *A. borkumensis* бактерияләре кушылган тирәлек (№ 1),
б) бактерияләрсез карамайлы тирәлек (№ 2),
в) *A. borkumensis* бактерияләре кушылган карамайлы тирәлек (№ 3)

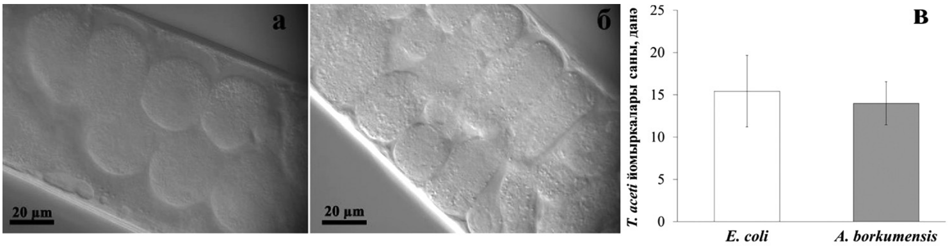
Суалчаннарның тирә-юньдәге химик сигналларны сизеп, аларга карата гади хемосизгер нейроннар системасы аша тормышка ашырылучы хемотаксислы үзтотышлары барлыгы билгеле [Hu *et al*., 2015]. Алар хемотаксисны, ягъни химик ярсыткыч тәэсирендә башкарылучы юнәлешле хәрәкәтне парларын, шулай ук бактерияләр җыелмасын эзләгәндә дә кулланалар. Хемотаксис нәтиҗәләре буенча *A. borkumensis* бактерияләренең *T. aceti* суалчаннары өчен репеллент булмавы, һәм әлеге суалчаннарның контроль бактерияләргә дә (*Escherichia coli,* 52%), тәҗрибәи бактерияләргә карата да (48%) якынча бертөрле илтифат итүләре ачыкланды. Өстәмә рәвештә хемотаксис индексын санау да башкарылды. Тикшеренү барышында алынган хемотаксис индексы (-0,2) суалчаннарның ике төр бактериягә карата да бертөсле илтифат итүен раслый. Димәк, суалчаннар *A. borkumensis* бактерияләреннән качмыйлар, һәм тирәлектә бирелгән бактерияләр генә булган очракта, суалчаннар актив рәвештә әлеге бактерияләр белән тукланачаклар.

T. aceti суалчаннарын бактерияләрсез карамайлы тирәлектә үрчеткән вакытта (2 нче рәсем) суалчаннарның өлкән чорга җитә алмаулары яисә альтернатив дауэр корты чорына күчүләре күтелде (дауэр корты чоры суалчаннарга тирә-юньдәге уңайсыз шартларны кичерергә ярдәм итә). Карамайлы тирәлектә суалчаннарның үрчүе 48 сәгатькә кимесә дә, әлеге суалчаннар, барлык корт чорларын узып, үрчетүнең алтынчы көненә өлгереп, йөкле чорга җиттеләр. Димәк, суалчаннар үрчү өчен мөһим барлык кирәкле матдәләрне дә ала алганнар дигән сүз.



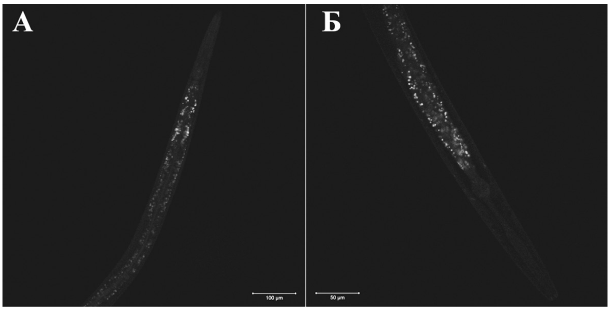
2 нче рәсем. 72 сәгать дәвамында бактерияләрсез карамайлы тирәлектә үрчетелгән *T. aceti* суалчанының а) караңгы кыр һәм б) оптик микросурәте

A. borkumensis бактерияләре кушылган карамайлы тирәлектә суалчаннар 96 сәгать эчендә өлгерәләр (*A. borkumensis* бактерияләре баетылган стандарт туклыклы тирәлектә дә шулай ук). *A. borkumensis* бактерияләре белән үрчетү, *E. coli* бактерияләре белән үрчетү төсле үк (бер суалчанга 15 ± 4 йомырка туры килә), суалчаннарның үрчемлелегенә тәэсир итми (бер суалчанга 14 ± 3 йомырка туры килә, 3 нче рәсем).



3 нче рәсем. а) *E. coli* яисә б) *A. borkumensis* бактерияләре белән тукланган *T. aceti* суалчаннарының аналыкларындагы йомыркалар; в) өч көн дәвамында *E. coli* яисә *A. borkumensis* бактерияләре белән тукланган суалчаннарда йомыркаларның бүленеше

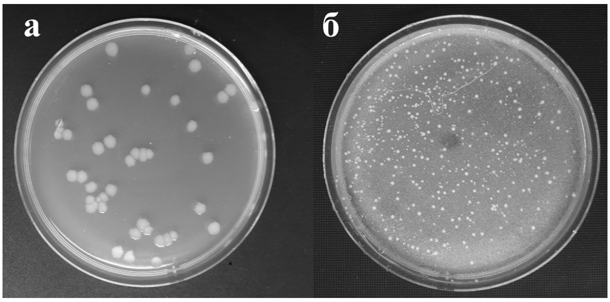
Тикшеренү барышында суалчаннар эчәклегенең бактериаль колонизациясен бәяләү буенча тәҗрибәләр дә уздырылды. Йоткылыкның терминаль бүлбүсендә урнашкан ваклаучы аппарат гадәттә бактерияләрне таркатып бетерә [Cho, Bandyopadhyay, 2012]. L1 чорында булган суалчаннар 72 сәгать дәвамында *E. coli* бактерияләре белән тукланган вакытта, суалчаннарның эчәклегендә таркатылмаган бактерияләр күзәтелмәде. Хәлбуки *A. borkumensis* белән тукланганнан соң, суалчаннарның ашкайнату тракты бактерияләр белән тулы булуы ачыкланды (4 нче рәсем).



4 нче рәсем. 72 сәгать дәвамында бактерияләр белән тукланган суалчаннарның эчәклек колонизациясен үз эченә алган микросурәтләр (А – *E. coli*, Б – *A. borkumensis*). Бактерияләр CFSE (карбоксифлуоресцеин сукцинимидиллы эфир) флуоресцент буягычы белән билгеләнгәннәр

Эчәклек колонизациясе һәм суалчаннарның үлеме арасында бәйләнеш булуга карамастан, әлеге күрсәткечләр һәрвакытта да суалчаннарның үлеменә китерми. Мәсәлән, *Enterococcus faecium* бактерияләре дә эчәклектә күп күләмдә тупланырга мөмкин, әмма бу вакытта өлгергән суалчаннар үлми, кабатланып торучы инфекция барышы да күзәтелми [Garsin *et al*., 2001].

Тикшеренү барышында күзәтелгән карамай таркатучы бактерияләрнең туплану күренеше даими түгел: *T. aceti* суалчаннарын *E. coli* бактерияләре белән азыкландырган вакытта, *A. borkumensis* бактерияләре ашкайнату тракты буйлап узып, бер сәгать эчендә тышкы тирәлеккә чыгарылалар. Эчәклек колонизациясенең дәрәҗәсен билгеләү өчен исә *T. aceti* эчәклегеннән алынган *E. coli* һәм *A. borkumensis* бактерияләренең колония барлыкка китерүче берәмлекләре (КББ; рус. КОЕ – колониеобразующая единица) саналды (5 нче рәсем).



5 нче рәсем. Суалчаннарның эчәклегендә *E. coli* (а) һәм *A. borkumensis* (б) бактерияләренең тупланышы

E. coli белән тукланган суалчаннарның эчәклегеннән алынган бактерия популяцияләренең күләме күп түгел (бер суалчанга 8 КББ туры килә). Бу күрсәткеч бактерияләрнең күп өлеше эчәклектә ашкайнатылып бетүен раслый. *A. borkumensis* бактерияләре белән үрчетелгән суалчаннарда ашкайнатылмаган бактерияләр саны күбрәк (бер суалчанга 23 КББ туры килә), бу исә суалчаннар эчәклегенең колонизацияләнүен күрсәтә, шулай итеп, *A. borkumensis* белән тукланган суалчаннарда билгеләнгән КББ саны *E. coli* кушылган тирәлектә үрчетелгән суалчаннарныкына караганда 2,9 тапкыр күбрәк.

Шуны да билгеләп үтәргә кирәк: *A. borkumensis* бактерияләре белән тукланган суалчаннарның дефекация (эчәклектәге азык калдыкларын чыгару) барышы бозылмавы ачыкланды. Бу үз чиратында карамай таркатырга сәләтле бактерияләрне тирәлек буйлап таратуда югары нәтиҗәгә ия булырга мөмкин: суалчаннар тирәлек буйлап һәрдаим хәрәкәт итеп торалар, эшкәртелмәгән, үрчергә сәләтле бактерияләр дә тарала бара, бу исә биоремедиация барышын тагын да тизрәк һәм нәтиҗәлерәк итәргә мөмкин. Димәк, бик югары булмаган эчәклек колонизациясенә карамастан, дефекация барышының бозылмавы эшкәртелмәгән бактерияләрнең тышкы тирәлеккә чыга алуы күрсәткече булып тора.

Шулай итеп, *A. borkumensis* бактерияләренең эчәклек микрофлорасына ярашуын тикшерү нәтиҗәсендә, карамай таркатучы

A. borkumensis бактерияләренең *T. aceti* суалчаннары тарафыннан бердәнбер азык чыганагы буларак үзләштерелә алуы һәм әлеге бактерияләрнең суалчаннарның физиологиясенә зарар китермәве ачыкланды. *T. aceti* суалчаннары һәм *A. borkumensis* бактерияләренең «хуҗа – микрофлора» системасындагы үзара мөнәсәбәтләрен тикшерү барышында алынган нәтиҗәләр карамай белән пычранган тирәлекләрне чистартуга юнәлтелгән системалар булдыру һәм аларның нәтиҗәсен арттыру өчен нигез булып тора.

Әдәбият

Третьякова М. С. Перспективы использования эндо- и ризосферных микроорганизмов для восстановления загрязненных нефтью почв // дис. … канд. биол. наук: 03.02.08. Иркут. гос. ун-т. Иркутск. 2018. С. 121.

Cho J. H., Bandyopadhyay J. Animal Models for *Salmonella* pathogenesis: studies on the virulence properties using *Caenorhabditis elegans* as a model host // Salmonella. A Diversified Superbug / ed. by Y. Kumar. 2012. P. 434–448.

Cuny P., Miralles G., Cornet-Barthaux V., Acquaviva M., Stora G., Grossi V., Gilbert F. Influence of bioturbation by the polychaete *Nereis diversicolor* on the structure of bacterial communities in oil contaminated coastal sediments // MarPollutBull. 2007. V. 54. P. 452–459.

Garsin D.A., Sifri D.S.D., Mylonakis E., Qin X., Singh K.V., Murray B.E., Calderwood S. B., Ausubel F. M. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors // Proc Natl Acad Sci U S A. 2001. V. 9. P. 10892–10897.

Golyshin P.V. A. Martins Dos Santos , Kaiser O., Ferrer M., Sabirova Y., Lünsdorf H., Chernikova T., Golyshina O., Yakimov M., Pühler A., Timmis K. Genome sequence completed of *Alcanivorax borkumensis*, a hydrocarbon-degrading bacterium that plays a global role in oil removal from marine system // J Biotechnol. 2003. V. 106. P. 215–220.

Hu L., Ye J., Tan H., Ge A., Tang L., Feng X., Du W., Liu B. Quantitative analysis of *Caenorhabditis elegans* chemotaxis using a microfluidic device // Anal. Chim. Acta. 2015. V. 887. P. 155–162.

Zhou J., Chen D., Huang R., Huang G., Yuan Y., Fan H. Effects of bacterial-feeding nematodes on soil microbial activity and the microbial community in oil-contaminated soil // J Environ Manage. 2019. V. 234. P. 424–430.

Тикшеренү эше Россия Федерациясе президентының фәннәр докторы булган яшь галимнәргә булышлык итүгә юнәлтелгән МД-2153.2020.3 номерлы гранты ярдәмендә тормышка ашырылды

Фахруллин Равил Фәрид улы,
биология фәннәре докторы, Казан (Идел буе) федераль университеты, Фундаменталь медицина һәм биология институты баш гыйльми хезмәткәре

Шәйхелова Сәрбиназ Фәнис кызы,
Казан (Идел буе) федераль университеты бакалавры, Фундаменталь медицина һәм биология институты лаборанты

Фахруллина Гөлнур Илдар кызы,
Казан (Идел буе) федераль университеты аспиранты, Фундаменталь медицина һәм биология институты гыйльми хезмәткәре

Нигәмәтҗанова Ләйсән Рәфис кызы,
Казан (Идел буе) федераль университеты, Фундаменталь медицина һәм биология институты гыйльми хезмәткәре