

УДК 579.66

В.Н. ФЕДОРЕНКО\*, И.Н. СЕРЕЖКИН, Я.А. ЛАМОВА, М.К. КНЯЗЮК, А.И. НЕТРУСОВ, А.И. ШЕСТАКОВ

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991

e-mail: vndorenko@gmail.com

## Свойства естественных углеводородокисляющих микробных сообществ для утилизации нефтяных загрязнений в Северных регионах

Из нефтезагрязненных природных материалов Северных регионов выделены 3 углеводородокисляющих микробных сообщества — Nsk1, Nsk2 и Csha2. Исследование динамики их роста при температуре культивирования 4° и 20° показало, что сообщества являются психротолерантными. Эффективность деструкции нефти при пониженной температуре в период с 10-е по 20-е сутки культивирования для консорциумов Nsk1 и Nsk2 составляет более 30%, для консорциума Csha2 — более 70%. Показано, что микробное сообщество Nsk1 обладает высокой биоэмульгирующей активностью, достигающей 65,9%. Изучаемые сообщества микроорганизмов характеризуются высокой выживаемостью (например, в процессе лиофилизации) с сохранением углеводородокисляющей и биоэмульгирующей активности. Исследуемые микробные сообщества могут быть использованы с целью создания препаратов для биоремедиации нефтяных загрязнений акваторий Северных морей и их прибрежных зон.

*Ключевые слова:* биодеструкция, биопрепарат, биоремедиация, биоэмульгирование, нефть, углеводородокисляющие микроорганизмы.

Прогнозируемое истощение углеводородных запасов месторождений нефти ведет в настоящее время к их поиску в таких зонах нефтеразведки, как Северный Ледовитый океан с его окраинными морями и области арктического шельфа, где предположительно располагается около 25% земных нефтяных и газовых месторождений. Вместе с тем, возрастает степень загрязнения северных морей нефтью и нефтепродуктами, что обуславливает необходимость развития технологий очистки акваторий от этих поллютантов. Биотехнологичес-

кие способы очистки, основанные по преимуществу на внесении в загрязненные среды углеводородокисляющих микроорганизмов в составе биопрепаратов, зарекомендовали себя как эффективные и наиболее экологичные средства охраны окружающей среды [1, 2]. Микроорганизмы в составе препаратов для использования в условиях Крайнего Севера должны быть адаптированы к низкой температуре, повышенной концентрации соли, низкому содержанию питательных веществ. Применение аборигенных микроорганизмов наиболее це-

---

Федоренко Виктория Николаевна, Сережкин Илья Николаевич, Ламова Яна Андреевна, Князюк Маргарита Константиновна, Нетрусов Александр Иванович, Шестаков Андрей Иннокентьевич.

*Список сокращений:* ГЖХ — газожидкостная хроматография; КЖ — культуральная жидкость; КОЕ — колониеобразующая единица; НД — смесь товарной нефти и дизельного топлива; ОП — оптическая плотность; ПАВ — поверхностно-активное вещество; СОМ — сухое обезжиренное молоко; среда РСА (plate count agar) — твердая агаровая среда.

\* Автор для переписки.

лесообразно, так как при этом сокращается время адаптации микробных клеток не только к факторам среды, но и к загрязняющим веществам.

Современные препараты создаются на основе чистых культур микроорганизмов или естественного консорциума [3]. Препараты, в состав которых входят ассоциации микроорганизмов, имеют более широкие адаптационные и экологические возможности для использования [4]. Вместе с тем, в литературе практически отсутствуют данные по изучению микробных сообществ, осуществляющих деструкцию нефтяных загрязнений в Арктике.

Цель работы — исследование способности выделенных из арктического региона микробных сообществ к утилизации углеводов в условиях низких температур и повышенной концентрации соли с перспективой их использования в целях биоремедиации в климатических условиях Северных регионов.

#### УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

**Материалом для исследования** являлись образцы морской воды, грунта, растительной биомассы, собранные в загрязненных углеводородами участках портовой зоны, набережной и объектов инфраструктуры побережья городов Мурманск и Кандалакша.

**Состав питательных сред; условия культивирования микроорганизмов.** Для получения накопительных культур, хроматографического и гравиметрического анализа использовали модифицированную среду Таусона, г/л; [5]:  $K_2HPO_4$  («Химмед», Россия) — 1,5;  $KH_2PO_4$  («Химмед») — 0,75;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (AppliChem) — 1,0;  $(NH_4)_2SO_4$  (AppliChem) — 4,0; NaCl (Panreac) — 30; гидролизат казеина (HiMedia) — 0,5; дрожжевой экстракт (Helicon) — 0,1, pH 7,0. Среду готовили на дистиллированной воде и стерилизовали паром при 0,5 ати 30 мин.

В качестве модельного углеводородного субстрата использовали смесь товарной нефти Возейского месторождения и дизельного топлива (НД) в соотношении 1:1 по объему, которую стерилизовали паром при 1 ати 30 мин и вносили в среду после стерилизации в количестве 1% по объему.

Культивирование микроорганизмов проводили в круглодонных колбах емкостью 250 мл в орбитальном шейкере (130 об/мин) с системой контроля температур Innova 43 (New Brunswick Scientific) при 4° в течение 7—10 сут.

**Общую микробную численность** определяли методом Коха на модифицированной плот-

ной среде Plate Count Agar (PCA), г/л:  $K_2HPO_4$  — 1,5;  $KH_2PO_4$  — 0,75;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 1,0;  $(NH_4)_2SO_4$  — 4,0; NaCl — 30; гидролизат казеина — 5,0; дрожжевой экстракт — 2,5; D(+)-глюкоза (AppliChem) — 1,0; пластинчатый агар (ФГУП ГНЦ ПМИБ, Оболенск) — 14; pH 7,0. Среду стерилизовали паром при 0,5 ати в течение 30 мин. Посевы инкубировали при 4° в течение 4—7 сут.

Выращивание биомассы для лиофильного высушивания микроорганизмов проводили в модифицированной жидкой среде на основе PCA.

**Динамику роста** в среде Таусона, обогащенной 1 г/л глюкозы, и в среде на основе PCA оценивали по величине оптической плотности (ОП) при длине волны 540 нм на спектрофотометре (LKB Biochrom 4050 Ultrospec II UV/VIS) с длиной оптического пути 1 см.

**Степень деструкции нефти определяли** весовым методом [6] по суммарному показателю убыли нефти и методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) на приборе DSA 100 KRüS (Drop Shape Analysis System, KRüS GmbH) с капиллярной колонкой DB-1ms (Agilent). Контролем для оценки степени испарения легких углеводородных фракций служила питательная среда с добавлением 1 мл НД (1:1), находившаяся в отдельной колбе на шейкере вместе с опытными образцами. Для оценки деструкции углеводородов использовали углеводородный индекс ( $k_i$ ) — отношение суммы пристана и фитана ( $C_{19}$  и  $C_{20}$ , соответственно) к сумме *n*-алканов ( $C_{17}$  и  $C_{18}$ ):  $k_i = (i-C_{19} + i-C_{20}) / (n-C_{17} + n-C_{18})$ , характеризующий деградацию исходных нефтепродуктов [6]. Результаты хроматографии обрабатывали с помощью программного обеспечения OpenLAB CDS (Agilent), MS Office Excel.

**Эмульгирующую активность** определяли визуально, согласно методике [7], а также методом Купера [8]. Индекс эмульгирования рассчитывали спустя 24 ч после проведения эксперимента как отношение объема плотной эмульсии ( $V_9$ , мл), образуемой при перемешивании изучаемого раствора с гексадеканом, к общему объему раствора ( $V$ , мл), умноженное на 100%:  $E_{24} = V_9 / V \cdot 100\%$ , где  $V = 10$  мл.

**Лиофильное высушивание в ампулах** проводили по стандартной методике [9]. В качестве защитной среды использовали раствор сухого обезжиренного молока (СОМ) (Слущкий сыродельный комбинат (Беларусь)) с глюкозой [10]: СОМ — 10%; глюкоза — 7,5%. Суспензии микроорганизмов разливали по 0,5 мл в стерильные ампулы из нейтрального стекла. Соотношение защитная среда—биомасса составляло 1:10 по объему.

**Лиофильное высушивание в колбах.** В качестве защитных сред использовали одну из трех добавок: СОМ, пшеничную муку 1 сорта («Каждый День», Aushan) или сухую подсырную молочную сыворотку (Лепельский молочный комбинат, Беларусь). Добавки стерилизовали сухим жаром 2,5 ч при 120°. Биомассу микроорганизмов сообщества Nsk1 предварительно выращивали в круглодонных колбах емкостью 250 мл в 100 мл жидкой питательной среды на основе РСА при 20° на шейкере в течение 24 ч. Протекторы вносили в количестве 10%, затем суспензии перемешивали 10 мин при 220 об/мин и 4° для равномерного распределения вещества в культуральной жидкости (КЖ). Соотношение защитная среда—биомасса составляло 1:10 по объему. Перед лиофилизацией колбы с микробной биомассой и защитной средой замораживали в жидком азоте при –196°. Во время замораживания для равномерного распределения суспензии внутри всего объема колбы их вращали вокруг продольной оси с целью формирования слоя замороженной суспензии толщиной не более 0,5 см.

Биомассу микроорганизмов сообщества Csha2 выращивали в 1250 мл питательной среды на основе РСА в ферментере объемом 3 л (LiFlus, Biotron). Культивирование проводили в режиме рН-стагирования, используя стерильные растворы 2 н. NaOH и 0,1 М HCl. Инокулят вносили в количестве 10% от объема сосуда. Режим перемешивания соответствовал 300 об/мин, температура культивирования составляла 20°, рН — 7,2, барботирование воздухом — 1,5 л/мин. Интенсивность роста культуры отслеживали по ОП, которую измеряли на спектрофотометре в кюветах (1 см) при длине волны 540 нм до достижения культурой стационарной фазы роста. Выращенную в ферментере биомассу помещали (по 100 мл) в круглодонные колбы емкостью 250 мл и готовили к лиофильному высушиванию по описанной выше схеме.

Лиофилизацию проводили на установке для лиофильной сушки Labconco FreeZone 1 L (США) при глубине вакуума 4,3 Па, температуре конденсатора –52° в течение 2 сут. По окончании высушивания газовую фазу в вакуумной камере замещали осушенным инертным газом (аргоном) во избежание попадания влажного воздуха в ампулы и колбы. Ампулы с высушенной биомассой запаивали под глубоким вакуумом (–1 бар) с помощью газо-кислородной горелки. Запаиваемые ампулы хранили при различных температурах (4°, 55°) для исследования выживаемости клеток. Колбы с лиофилизованной биомассой, укупоренные стерильными резиновыми пробками, хранили при 4°.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Микробные сообщества

При отборе микробных ассоциаций использовали следующие показатели: помутнение среды (водной фазы), изменение ее цвета, образование осадка, изменение свойств нефти, а также снижение рН КЖ. В результате исследования из загрязненных углеводородами проб были получены три наиболее активных углеводородокисляющих микробных сообщества Nsk1, Nsk2 и Csha2, стабильных в течение более чем 30 пересевов на среде с углеводородами при температуре культивирования 4°. Для указанных сообществ были определены температурный диапазон роста, способность к продукции биоэмульгаторов, галотолерантность и способность к деструкции нефтяных углеводородов. Общая микробная численность во всех исследуемых микробных сообществах достигала не менее 10<sup>7</sup> КОЕ/мл.

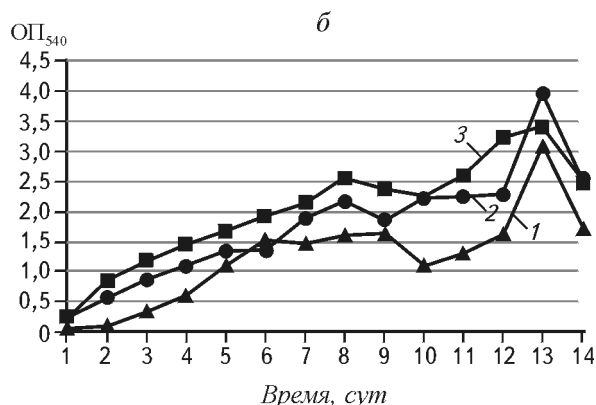
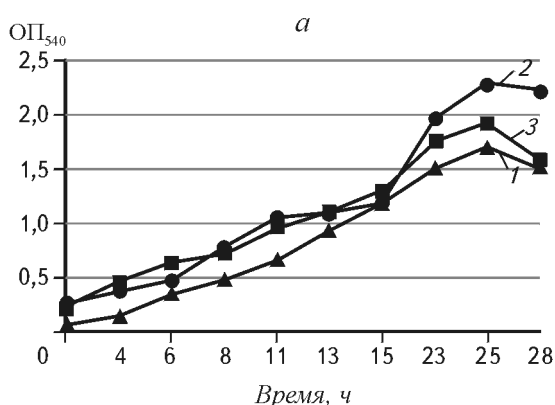
### Динамика роста

Был исследован температурный диапазон роста селекционированных микробных сообществ. Все ассоциации активно росли при температуре 4—20°, о чем свидетельствуют результаты кинетических исследований, представленные на рисунке (а, б). Это позволяет предположить, что среди микроорганизмов, составляющих данные консорциумы, присутствуют как психрофильные, так и психроактивные и даже мезофильные представители. Данный факт свидетельствует о широких метаболических возможностях этих сообществ.

Культивирование микроорганизмов при 20° показало, что все они достигают стационарной фазы уже на 2-е сутки культивирования (см. рисунок, а).

При выращивании микробных сообществ на модифицированной среде Таусона при 4° с 8—9-х суток культивирования все кривые роста носят колебательный характер и стационарная фаза ни у одного из сообществ четко не выражена: сразу после максимального значения ОП биомассы на 13-е сутки наблюдается ее резкое снижение уже на 14-е сутки культивирования (см. рисунок, б). Несмотря на снижение скорости роста, вероятно, обусловленной снижением интенсивности химических реакций по сравнению с сообществами, растущими при более высоких температурах, конечная концентрация клеток в целом была более высокой при 4° культивирования (сравни рисунок, а и б). Это может свидетельствовать о нали-

## СВОЙСТВА ЕСТЕСТВЕННЫХ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ



Динамика роста микробных сообществ в модифицированной среде Таусона с глюкозой: а — при 20°; б — при 4°. Микробные сообщества: 1 — Nsk1; 2 — Nsk2; 3 — Csha2

чий в исследуемых микробных сообществах психрофильных микроорганизмов, которые при 20° представляют собой минорный компонент сообщества, в то время как пониженная температура создает условия для их роста и развития с последующим доминированием в сообществе. В целом, судя по достаточно широкому температурному диапазону роста микроорганизмов, можно заключить, что выделенные микробные сообщества являются психротолерантными.

### Биоэмульгирующая активность

По литературным данным, процесс утилизации субстратов в окружающей среде, в частности, углеводов, может находиться под регуляторным контролем поступающих в среду легкометаболизруемых углеводов [11—13].

В исследованиях Т.В. Корнелли с соавт. [14] показано, что присутствие в окружающей среде углеводов активирует у микроорганизмов-деструкторов синтез биоПАВ, которые стимулируют потребление углеводов бактериальными клетками. Поэтому с целью подтверждения гипотезы, что образование ПАВ, как и других продуктов микробного синтеза, зависит от условий выращивания продуцента, микробные сообщества выращивали на двух типах сред при разных температурах — 4 и 20°.

Степень эмульгации визуально оценивали, соотнося ее с цифровой шкалой от «0» до «3». Устойчивая без перемешивания в течение одного часа эмульсия, состоящая из мелкодисперсных частиц, образование которой сопровождается изменением цвета нефти с черного на бурый, оценивалась в 3 балла; устойчивая до нескольких десятков минут эмульсия в виде мицелл типа «масло в воде» и «вода в масле» — в 2 балла; эмульсия в виде крупных мицелл и плотных частиц углеводов

дов — в 1 балл; отсутствие эмульгирующей активности, наличие в пробе нефтяной пленки или нераспределенной комковатой массы нефтепродуктов оценивали в 0 баллов. Согласно методике, эмульгирующая активность сообществ Csha2 и Nsk2 соответствовала 3 баллам, а активность сообщества Nsk1 — 2 баллам.

Методом Купера [8] устойчивые эмульсии были обнаружены только у сообщества Nsk1 (табл. 1). Наибольшая продукция ПАВ наблюдалась при росте сообщества в жидкой среде на основе PCA при 20°, однако на модифицированной среде Таусона при обеих температурах значения индекса эмульгирования также были высокими. Эмульсии, полученные при низкой температуре, отличались стабильностью и устойчивостью в течение суток.

Для сообществ Nsk2 и Csha2 эмульгирующая активность показана только непосредственно сразу после встряхивания клеточных суспензий с гексадеканом; спустя 24 ч она исчезала. Однако при культивировании в среде с добавлением нефти у данных микробных сообществ визуально обнаруживалась более высокая по сравнению с сообществом Nsk1 способность к образованию коллоидных растворов, проявляющаяся в расслоении нефтяной пленки и образовании мицелл. Отмечено и изменение консистенции нефтепродукта, цвета раствора, что свидетельствует о его превращении в эмульсию, так как под действием микроорганизмов происходит разрыв длинных углеводородных цепей на более короткие. На основании полученных результатов можно предположить, что синтез ПАВ этими ассоциациями микроорганизмов имеет индуктивную природу. Возможно, продуценты биоПАВ в исследуемых консорциумах синтезируют сурфактанты эндо-типа, прочно связанные с клеточной стенкой, вследствие чего их обнаружение методом Купера затруднено.

### Определение биоэмульгирующей активности при различных условиях культивирования

| Микробное сообщество | Индекс эмульгирования, %             |      |             |      |                                |      |             |      |
|----------------------|--------------------------------------|------|-------------|------|--------------------------------|------|-------------|------|
|                      | Модифицированная среда на основе РСА |      |             |      | Модифицированная среда Таусона |      |             |      |
|                      | Сразу после встряхивания             |      | Спустя 24 ч |      | Сразу после встряхивания       |      | Спустя 24 ч |      |
|                      | 20°                                  | 4°   | 20°         | 4°   | 20°                            | 4°   | 20°         | 4°   |
| Nsk1                 | 65,9                                 | 25,9 | 50,0        | 22,2 | 47,6                           | 48,1 | 25,9        | 44,2 |
| Nsk2                 | 0                                    | 31,2 | 0           | 0    | 0                              | 0    | 0           | 0    |
| Csha2                | 0                                    | 3,7  | 0           | 0    | 2,4                            | 24,0 | 0           | 0    |

#### Биодеструкция нефти

Оценку степени биодеградациии нефти проводили на основании изменения состава нормальных и изопреноидных алканов при 4°. Основная убыль углеводов для всех микробных сообществ происходила в период с 10-е по 20-е сутки культивирования, что, по всей видимости, связано с активизацией ассоциации микроорганизмов в первые 10 сут и постепенным накоплением ферментов окисления углеводов и ПАВ. Количественный анализ утилизации различных фракций алканов показал, что наиболее активным деструктором углеводов является сообщество Csha2, для которого степень деструкции *n*-алканов средне- (C<sub>12</sub>—C<sub>23</sub>) и высококипящих (C<sub>20</sub>—C<sub>32</sub>) фракций составляла 76,8% и 71,9%, соответственно. По данным гравиметрического анализа, углеводородокисляющая активность микроорганизмов данного сообщества составила около 83%. Для сообщества Nsk1 степень утилизации алканов *n*-C<sub>12—19</sub> достигала 34,1%, а алканов *n*-C<sub>20—32</sub> — 22,9%; для Nsk2 аналогичные показатели были равны 8,4% и 31,9%, соответственно.

По результатам хроматографического анализа можно сделать вывод, что исследуемые микробные сообщества обладают избирательностью в отношении углеводов нефти и спустя 10 сут в первую очередь подвергают деструкции легкие ароматические углеводороды и нормальные алканы C<sub>12</sub>—C<sub>19</sub>. На это указывает и нарастание численности микробиоты, которое наблюдали до 13-х суток эксперимента (см. рисунок, б).

Значения углеводородных индексов для разных микробных сообществ на 20-е сутки культивирования были следующие: для Nsk1 — 58,62;

Nsk2 — 0,62; Csha2 — 1,17 ( $k_i$  контрольного образца составлял 0,49). Увеличение значения углеводородного индекса по сравнению со значением для контрольного образца свидетельствует о ферментативной дегградации углеводов клетками микроорганизмов. Однако значение  $k_i$  меньше 1 указывает на слабую степень этой дегградации, так как микроорганизмы значительно хуже метаболизируют изопреноидные соединения, подобные пристану и фитану. Таким образом, можно сделать вывод об интенсивной утилизации углеводов микробными сообществами Nsk1 и Csha2, что согласуется с данными газохроматографического анализа по степени деструкции нефти указанными консорциумами и исследований биоэмульгирующей активности микроорганизмов.

#### Хранение в ампулах

Для длительного сохранения культур микроорганизмов в коллекционной форме использовали способ лиофильного высушивания клеток в ампулах. О применимости этого процесса судили по сохранению жизнеспособности и катаболической активности бактерий. Для этого после лиофилизации проводили оценку выживаемости и углеводородокисляющей, биоэмульгирующей активности клеток при 4° в условиях интенсивной аэрации на протяжении трех последовательных пересевов.

Все испытываемые сообщества микроорганизмов показали высокую жизнеспособность, проявляющуюся в накоплении обильной биомассы в жидкой среде в условиях низкой температуры, помутнении питательной среды, образовании мицелл нефти у поверхности раздела фаз и разбивании пленки нефти. Значения рН при этом соответствовали исходным (7.0).

После лиофилизации образцы подвергали тесту на «ускоренное хранение» при температуре 55° [15]. Прогнозирование срока хранения препарата осуществляли с использованием правила Вант-Гоффа, согласно которому с возрастанием температуры хранения на 10° в лиофилизированных препаратах происходит двукратное увеличение скорости физико-химических реакций. Показано, что исследуемые образцы спустя 10 сут хранения при указанной температуре не утратили способность к росту и активность в отношении углеводов. Таким образом, по крайней мере в течение этого времени лиофилизированные препараты выделенных микробных сообществ могут храниться без потери активности. Исходя из правила Вант-Гоффа, можно предположить, что продолжительность хранения образцов при 35° с использованием защитной среды «СОМ+глюкоза» составляет не менее 40 дней, а при 4° — не менее 11 мес.

### Хранение в колбах

Для получения лабораторных прототипов биопрепарата был испытан метод лиофильного высушивания биомассы в колбах. Эксперимент проводили с сообществами Nsk1 и Csha2. Биомассу микроорганизмов ассоциации Nsk1 выращивали при 20° в колбах, Csha2 — в ферментере в режиме периодического культивирования, после чего суспензию клеток распределяли в колбы по 100 мл. Питательные добавки для активации клеток после высушивания и сохранения минерально-солевого фона в препарате вносили в количестве 10% непосредственно в КЖ по окончании культивирования.

Установлено, что из трех выбранных добавок (см. раздел «Условия эксперимента») сухая молочная сыворотка неприменима для подобной технологии приготовления высушенного препарата: в процессе высушивания наблюдали активное вспенивание образцов за счет их быстрого нагревания, что приводило к падению титра жизнеспособных клеток.

Оценку эффективности высушивания микробных сообществ с питательными добавками СОМ и мука проводили путем определения титра микроорганизмов до и после лиофильного высушивания методом Коха (табл. 2).

Из двух протестированных питательных добавок лучшие результаты показало СОМ: снижение титра менее чем на 10% для образца «Nsk1+СОМ», вероятно, обусловлено более разнообразным и полноценным составом питательных веществ данной добавки.

Спустя 10 сут после посева лиофилизированных лабораторных препаратов в среду Таусона с нефтью при 4° установлено, что большинство образцов сохранили способность к эмульгированию нефти, которая, тем не менее, снизилась в случае вариантов Csha2+СОМ и Csha2+мука, и визуально оценивалась в 1 балл. Данный факт, возможно, связан с частичной потерей в ходе сушки активных продуцентов биоПАВ.

Таким образом, в результате выполненной работы показано, что все микробные сообщества являются психротолерантными, на что указывает исследованный температурный диапазон роста 4—20°, и галотолерантными, способными к росту при концентрации NaCl в среде до 3%. Показано также, что углеводородокисляющие микробные сообщества Nsk1, Nsk2 и Csha2 способны к деструкции углеводов в условиях низких температур, убыль которых в период с 10-е по 20-е сутки культивирования, согласно данным хроматографического анализа, составляет от 8,4 до 76,8% для среднекипящей фракции нефти и от 22,9 до 71,9% для высококипящей фракции. Для микробного сообщества Nsk1 показано наличие высокой биоэмульгирующей активности, достигающей 65,9% в богатой модифицированной среде на основе РСА (см. табл. 1). Микробные консорциумы сохраняют стабильность в течение более 30 пересевов при 4°, что делает их перспективными для биотехнологических разработок. Результаты оценки выживаемости лабораторных прототипов биопрепарата,

Таблица 2

### Титр клеток лабораторных прототипов биопрепарата до и после лиофильного высушивания

| Микробное сообщество | Титр клеток до сушки, КОЕ/мл | Титр клеток после сушки, КОЕ/г сухого вещества |                     |
|----------------------|------------------------------|--|---------------------|
|                      |                              | +СОМ   | +Мука               |
| Nsk1                 | $9,6 \cdot 10^{12}$          | $8,7 \cdot 10^{12}$                            | $2,1 \cdot 10^9$    |
| Csha2                | $3,0 \cdot 10^{13}$          | $3,0 \cdot 10^{10}$                            | $1,0 \cdot 10^{11}$ |

полученных двумя способами лиофильного высушивания, и данные о сохранении ими активности в отношении углеводов указывают на возможность их использования в качестве основы при разработке биопрепаратов для ремедиации нефтяных загрязнений Северных регионов.

Получено 14.10.15

## ЛИТЕРАТУРА

1. Мурзаков Б.Г., Битеева М.Б., Морщакова Г.Н. Биотехнология очистки нефтезагрязненных территорий. Обзор. инф. В. 3. — М.: НИИСЭНТИ, 1992. — 36 с.
2. Киреева Н.А., Водопьянов В.В., Мифтахова А.М. Биологическая активность нефтезагрязненных почв. — Уфа: Гилем, 2001. — 376 с.
3. Войно Л.И. Биодegradация нефтезагрязнений почв и акваторий // Фундаментальные исследования. — 2006. — № 5. — С. 68—70.
4. Rogozina E.A., Andreeva O.A., Zharkova S.I., Martynova D.A., Orlova N. A. Сравнительная характеристика отечественных биопрепаратов, предлагаемых для очистки почв и грунтов от загрязнения нефтью и нефтепродуктами // Нефтегазовая геология. Теория и практика. — 2010. — Т.5. — №3 [Электронный ресурс]. URL: [http://www.ngtp.ru/rub/7/37\\_2010.pdf](http://www.ngtp.ru/rub/7/37_2010.pdf) (дата обращения: 30.06.2015).
5. Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов. — Ленинград: Наука, 1974. — 193 с.
6. Другов Ю.С., Родин А.А. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов. — 2-е изд., перераб. и дополн. — М.: БИНОМ ЛЗ, 2007. — 392 с.
7. Rosenberg, E. Biosurfactants: The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria — 3rd ed. V. 1. [Eds. M. Dworkin, S. Falfow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt]. — New York, Springer Science+Business Media, Inc., 2006. — P. 834—849.
8. Cooper, D.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species / D.G. Cooper, G.G. Goldenberg // Appl. Environ. Microbiol. — 1987. — V. 53. — P. 224—229.
9. Stacey, G.N., Day, J.G. Long-term ex situ conservation of biological resources and the role of biological resource centers: Cryopreservation and freeze-drying protocols. — 2nd ed. [Eds. G.N. Stacey, J.G. Day] — Totowa, NJ: Humana Press, 2007. — P. 1—14.
10. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений. [Под ред. А. И. Нетрусова]. — М.: Издательский центр «Академия», 2005 — 608 с.
11. Гузев В.С. Регуляторное действие глюкозы на активность углеводородокисляющих микроорганизмов в почве / В.С. Гузев, Э.М. Халимов, М.И. Волде, И.С. Куличевская // Микробиология. — 1997. — Т.66. — № 2. — С. 154—159.
12. Rosenberg, E. Petroleum bioremediation — a multiphase problem / E. Rosenberg, R. Lagmann, A. Kushmaro, R. Taube, R. Adler, E.Z. Ron // Biodegradation. — 1992. — N 3. — P. 337—350.
13. Сребняк Е.А., Ботвинко И.В., Винокуров В.А., Малахова Д.В. Способ получения биопрепарата для восстановления водоемов, загрязненных нефтью или нефтепродуктами // Патент РФ RU 2327649, С 02 F 3/34, С 12 N 1/26. 2008.
14. Коронелли Т.В. Поверхностно-активные свойства некоторых штаммов углеводородокисляющих бактерий / Т.В. Коронелли, С.Г. Юферова // Вестн. Моск. ун-та. Серия 16. Биология. — 1990. — № 1. — С. 14—18.
15. Кузнецов В.Д. Прогнозирование выживаемости лиофилизированных спор *Actinomyces parvullus*, основанное на методе «ускоренного хранения» / В.Д. Кузнецов, С.Н. Филиппова, С.А. Муравьева, В.М. Фишман // Микробиология. — 1977. — Т. 46. — В. 2. — С. 318—323.

V.N. FEDORENKO\*, I.N. SEREZHKIN, Ya.A. LAMOVA,  
M.K. KNIAZYUK, A.I. NETRUSOV, and A.I. SHESTAKOV

The Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,  
119991, Moscow Russia

e-mail: vndorenko@gmail.com

## Characteristics of Natural Hydrocarbon-Oxidizing Microbial Communities for Utilization of Crude Oil Pollution in the Northern Regions

Three hydrocarbon-oxidizing microbial communities, Nsk1, Nsk2 and Csha2, have been isolated from the oil-polluted harbor sites of Northern Regions. The study of the growth dynamics at the cultivation temperatures of 4°C and 20°C showed their psychrotolerant nature. The efficiency of oil degradation at the low temperature for 10 to 20 days was more than 30% for Nsk1 and Nsk2 consortia and higher than 70% for the Csha2 consortium. The biosurfactant activity of Nsk1 was demonstrated to reach 65,9%. The microbial communities were shown to have the high survival index after lyophilization with the retention of the hydrocarbon-oxidizing and biosurfactant activities. The studied microbial consortia can be used in the creation of biopreparations for the bioremediation of oil pollution in the Northern seas and coastal areas.

*Key words:* biodegradation, biopreparation, bioremediation, biosurfactant activity, crude oil, hydrocarbon-oxidizing microorganisms.

\* Author for correspondence.