

УДК 579.69

Я.А. ДЕЛЕГАН^{1,2}, А.А. ВЕТРОВА², М.А. ТИТОК³, А.Е. ФИЛОНОВ^{1,2,*}

ФГБОУ ВПО «Пушкинский государственный естественнонаучный институт», Пушкино, Московская область, 142290

²ФГБНУ «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина» (ИБФМ), Пушкино, Московская область, 142290

³ Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь, 220030

e-mail: filonov.andrey@rambler.ru

Разработка консорциума термотолерантных бактерий как основы биопрепарата для ремедиации нефтезагрязненных грунтов и вод в жарком климате

Впервые разработана и предложена ассоциация термотолерантных нефтеокисляющих бактерий, состоящая из штаммов *Gordonia* sp. 1D ВКМ Ас-2720 Д, *Rhodococcus* sp. Paг7 ВКМ Ас-2722 Д и *R. pyridinivorans* L5A-BSU ВКМ Ас-2721, для деструкции нефти и нефтепродуктов в грунтах и водах в регионах с жарким климатом. Консорциум эффективен в грунте и жидких средах при температуре до 50°, солёности среды до 7% и влажности грунта около 10%. Так, эффективность разрушения нефти в грунте составила 70% и 59% за 21 сут при 24° и 45°, соответственно. Ассоциация термотолерантных штаммов-нефтедеструкторов может быть использована как основа биопрепарата для очистки нефтезагрязненных грунтов и вод в регионах с жарким климатом.

Ключевые слова: биодegradация, биоремедиация, жаркий климат, консорциум, нефть, термотолерантные бактерии.

В настоящее время уровень и общая площадь загрязнения грунтов и вод нефтью и нефтепродуктами непрерывно растёт. Особому риску подвержены территории и акватории в регионах, где располагаются месторождения и ведётся добыча нефти [1–3].

Для очистки нефтезагрязненных экосистем используют механические, термические, физико-химические и другие методы. Большинство этих методов имеют существенные недостатки, заключающиеся в основном в высокой стоимости и негативном воздействии на окружающую среду.

Альтернативой этим подходам является биоремедиация — использование микроорганизмов-нефтедеструкторов для очистки загрязнённых участков. Биоремедиация может быть основана на

стимуляции аборигенной микрофлоры [4, 5], однако в зонах с экстремальными условиями, где развитие микроорганизмов подавляется стрессовыми факторами среды (высокими или, наоборот, низкими температурами, закислением/зашелачиванием грунта, высокой осмолярностью), необходимо внесение биопрепаратов, в состав которых входят культуры, способные к росту и утилизации углеводородов в условиях таких воздействий.

Температура является ключевым фактором, определяющим тип ремедиационной стратегии. Для очистки вод и грунтов в холодном и умеренном климате на территории России и стран СНГ используют различные биопрепараты [6–10]. Однако эффективный способ биоремедиации нефтезагрязнённых участков в жарком климате пока не разработан. Высокие температуры в таких регио-

Делеган Янина Адальбертовна, Ветрова Анна Андрияновна, Титок Марина Алексеевна, Филонов Андрей Евгеньевич.

Список сокращений: ДТ — дизельное топливо; ИК — инфракрасный; КЖ — культуральная жидкость; КОЕ — колониеобразующая единица; ПАУ — полиароматические углеводороды; п. н. — пар нуклеотидов; ПЦР — полимеразная цепная реакция; среда LB — среда Луриа—Бертани.

* Автор для переписки.

нах являются причиной быстрого испарения воды из грунта и с поверхности водоемов, что приводит к их засолению. Поэтому для очистки нефтезагрязненных участков в таких регионах целесообразно использовать микроорганизмы, способные к катаболизму углеводов в условиях недостатка воды в грунте и повышенного содержания соли.

Такой способностью могут обладать термотолерантные бактерии. Особенность работы с этими бактериями состоит в том, что их культивирование и производство биомассы в промышленных масштабах могут осуществляться и в умеренных условиях, однако полученный препарат эффективен и при повышенной (до 50°) температуре. Учитывая сложный состав нефти как субстрата, в состав биопрепарата для ее утилизации следует включать не монокультуру, а ассоциацию микроорганизмов, способных утилизировать различные по структуре компоненты нефти [11—13].

Целью данной работы являлась разработка консорциума термотолерантных бактерий как основы биопрепарата для эффективной утилизации нефти в грунтах и водах в условиях жаркого климата (до 50°), в том числе при низкой влажности (10%) и повышенном (до 7%) содержании соли в среде. До настоящего времени в России и странах СНГ подобные препараты не были разработаны. Нет также данных о применении биопрепаратов, разработанных на основе термотолерантных бактерий, за рубежом.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Микроорганизмы, среды и условия культивирования. В качестве минеральных сред использовали среду Эванса [14] и М9 [15]; в качестве полноценных — среду Луриа—Бертани (LB) [16] (дрожжевой экстракт и пептон производства Difco, США) и среду 5/5 (ИБФМ РАН) следующего состава: аминокислоты (60 мг/л; «Биомед», Россия), гидролизат казеина (5 г/л; Panreas, Испания), дрожжевой экстракт (1 г/л; Difco), соевый экстракт (30 мг/л; Himedia, Индия). Для приготовления твердых сред использовали агар производства Pronadisa (Испания). Свойства нефти, используемой в качестве источника углерода, были следующие: плотность 0,868 г/см³, содержание воды 0,06%, солей — 45 мг/мл, механических примесей — 0,008%, серы — 1,42%.

Бактерии выделяли путем накопительного культивирования в жидкой минеральной среде с нефтью (2%) в течение 3 нед при 24°. После завершения культивирования проводили посевы при 24° на агаризованную среду Эванса с нефтью или дизельным топливом (ДТ) в качестве источника углерода и энергии (2% об.). Отдельные морфологически различные колонии высевали на агаризованную среду LB для подтверждения чистоты. Термотолерантные штаммы отбирали путем культивирования выделенных бактерий в жидкой среде Эванса с нефтью или ДТ при температуре 45° (табл. 1).

Таблица 1
Table 1

Термотолерантные штаммы, использованные в работе Thermotolerant strains used in the work

Штамм Strain	Источник Source
1B, 1D, 1G	Почва из шламонакопителя, Москва Soil from sludge collector, Moscow
Par5, Par7	Почва с территории нефтеразлива, Казахстан Soils from oil-spill territory, Kazakhstan
Par6, Par18	Нефгешлам с полигона, Казахстан Oil sludge from landfill, Kazakhstan
AL-18	Почва (Витебск, Беларусь) Soil (Vitebsk, Belarus)
L5A-BSU, A2-6, 8A-3A	Почва (Минск, Беларусь) Soil (Minsk, Belarus)

Филогенетический анализ генов 16S рРНК, *gyrB* и *alkB*. ДНК бактерий выделяли по методике [17]. ПЦР проводили на амплификаторе GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer, США) по стандартным протоколам с использованием праймеров, приведенных в табл. 2. ПЦР-продукты очищали по методике QIAquick PCR Purification Kit Protocol (QIAquick Spin Handbook, 2008). Секвенирование проводили в лаборатории молекулярной генетики Института вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава РФ на секвенаторе Applied Biosystems 3130×1 с использованием набора для секвенирования BigDye v. 3.1. Поиск гомологичных нуклеотидных последовательностей к фрагментам генов выполняли с помощью программы BLAST. Филогенетический анализ и построение филогенетических деревьев проводили с использованием пакета программ MEGA 6 Software.

Данные нуклеотидные последовательности хранятся в GenBank под следующими номерами: ген 16S рРНК — KR919788—KR919798, ген *alkB* — KT862535, KT894216, KT894217.

Определение спектра утилизируемых субстратов и галотолерантности штаммов. Бактерии культивировали в жидкой среде Эванса с добавлением дизельного топлива, ПАУ (нафталин, фенантрен, антрацен, флуорен) или алифатических углеводов (гексан, октан, декан, нонан, гексадекан, гептаметилнонан) производства Sig-

ma-Aldrich, Merck и Fluka. Жидкие углеводороды вносили в пробирки в концентрации 2% по объему, твердые — в виде порошка из расчета 1 г/л.

Для изучения устойчивости к содержанию соли в среде штаммы культивировали при 24° или 45° в жидкой среде Эванса с 3%, 5, 7 или 10% NaCl и 2% дизельного топлива.

Инокулят вносили до конечной концентрации клеток 10⁶ КОЕ/мл. Способность к росту оценивали визуально по степени помутнения культуральной жидкости в пробирках.

Определение нефтеокисляющей активности микроорганизмов. Штаммы термотолерантных бактерий культивировали в колбах с жидкой средой Эванса и 2% нефти при температуре 24° и 45° в течение 2 нед. По окончании культивирования остаточную нефть экстрагировали из образцов четыреххлористым углеродом (1:1), экстракт интенсивно перемешивали, после чего проводили измерение содержания в нем углеводов с помощью анализатора нефтепродуктов АН-2 (Россия) по протоколу [18]. Контролем служила стерильная проба, в которую были добавлены углеводороды, но не внесены микроорганизмы.

Изучение совместимости термотолерантных штаммов. Для выявления антагонизма штаммы высевали на агаризованную среду 5/5 перпендикулярными штрихами. Появление зон задержки

Таблица 2
Table 2

**Праймеры, использованные в работе
Primers used in the work**

Ген Gene	Праймер Primer	Температура отжига, °С Annealing temperature, °С	Размер продукта, п.н. Product size, bp	Ссылка Reference
16S rRNA	63f: CAGGCCTAACACATGCAAGTC 1387r: GGCGGGWGTGTACAAGGC	55	1300	[19]
<i>gyrB</i>	UP1-f: GAAGTCATCATGACCGTTCT GCAAYGCNGGNGGNAARTTYGA UP2-r: AGCAGGGTACGGATGTGCGA GCCRTCACRTCNGCRTCNGTCAT	60	1100	[20]
<i>alkB</i>	alkBF: ATCAAYRCVGCVCAYGAR YTVGGBCACAAG alkBR: SGGRTTCGCRTGRTGRTCR CTGTGNSGYTG	66	558	[21]

роста и/или лизиса свидетельствовало бы о подавлении роста одного из штаммов веществами, продуцируемыми другим штаммом.

Для проверки стабильности смешанной культуры бактерии культивировали в жидкой минеральной среде с нефтью и в полноценной среде 5/5. Инокулят каждого штамма вносили в колбу в концентрации 10^5 КОЕ/мл. Культивирование вели в течение 3 сут на богатой среде и 14 сут на минеральной среде с нефтью при температуре 24° и 45° . В ходе культивирования пробы отбирали каждые сутки, выполняли серию стандартных разведений и высевали на чашки для подсчета численности клеток.

Составление консорциума термотолерантных штаммов и оценка его эффективности. Консорциумы термотолерантных бактерий составляли на основании изученных в работе свойств. Консорциумы культивировали в жидкой среде Эванса с 2% нефти и 3% соли при 24° или 45° в течение 2 нед. По окончании эксперимента измеряли остаточную концентрацию углеводов методом ИК-спектроскопии на анализаторе нефтепродуктов АН-2.

Моделирование процесса деструкции нефти в грунте консорциумом микроорганизмов. В стерильный песок вносили соль до конечной концентрации 3%, нефть (до 2%), стерильную жидкую среду Эванса (до 10%) и бактерии до конечной концентрации $1 \cdot 10^4$ КОЕ/г. Эксперимент проводили как с монокультурами, так и с консорциумом штаммов. Для получения консорциума отдельные монокультуры выращивали, готовили суспензии с концентрацией клеток $1 \cdot 10^4$ КОЕ/г и смешивали их в равных соотношениях. Субстратыхлили каждые 3—4 дня. Эксперимент выполняли как при 24° , так и при 45° . По окончании измеряли остаточную концентрацию углеводов методом ИК-спектроскопии на анализаторе нефтепродуктов АН-2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение чистых культур термотолерантных микроорганизмов и характеристика их основных физиологических параметров

Чистые культуры термотолерантных бактерий (см. табл. 1) выделяли путем температурной селекции при 45° из 86 штаммов бактерий-нефтедеструкторов, полученных методом накопительного культивирования из грунтовых и водных об-

разцов. Термотолерантные бактерии, исследуемые в данной работе, были способны расти и утилизировать нефть и отдельные углеводороды в диапазоне температур $18—50^\circ$. Оптимальной для роста бактерий являлась температура $35—37^\circ$, что существенно отличало их от широко распространенных мезофильных бактерий, оптимум роста которых не превышает $28—30^\circ$. Все исследуемые термотолерантные штаммы росли на нефти (в концентрации до 5%), а штаммы 1D, 1G, Par6, Par7 и Par5 — до 7% соли в среде культивирования, что делает их перспективными для применения при очистке засоленных грунтов и вод. Тем не менее, в задачи работы не входил поиск исключительно галофилов, поскольку введение дополнительного фактора селекции сужало бы область возможного применения препарата, создаваемого на основе термотолерантных штаммов.

Все изучаемые термотолерантные штаммы утилизировали нефть и дизельное топливо при температуре до 50° . Штаммы 1D, 1G, Par5, Par6, Par7, Par18 также росли в присутствии в среде линейных алканов (до C_{20}) в качестве источника углерода и энергии. Штаммы AL-18 и L5A-BSU являлись деструкторами полиароматических соединений нафталина, антрацена, фенантрена, флуорена, бифенила и пирена. Таким образом, широкие метаболические возможности этих штаммов позволяют использовать их для составления консорциумов с целью дальнейшего применения в составе биопрепарата.

Филогенетический анализ и идентификация термотолерантных бактерий

Согласно результатам анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК, среди исследуемых термотолерантных штаммов имеются представители родов *Gordonia* и *Rhodococcus*. Штаммы Par5, Par6, Par7, Par18 отнесены к роду *Rhodococcus*; штаммы 1B, 1D и 1G — к роду *Gordonia*.

При определении видового статуса штаммов *Gordonia* в качестве маркера использовали ген *alkB*, кодирующий алканмонооксигеназу. Ранее [22, 23] было показано, что белок-кодирующие гены, такие как *gyrB* и *catA*, эволюционируют быстрее, чем гтп-опероны, а потому более информативны при таксономическом анализе гордоний. Также ранее уже было установлено, что варибельность нуклеотидных последовательностей гена *alkB* может быть использована для видовой дифференциации штаммов р. *Gordonia* наряду с другими филогенетическими маркерами — 16S рРНК, *gyrB* и *catA*

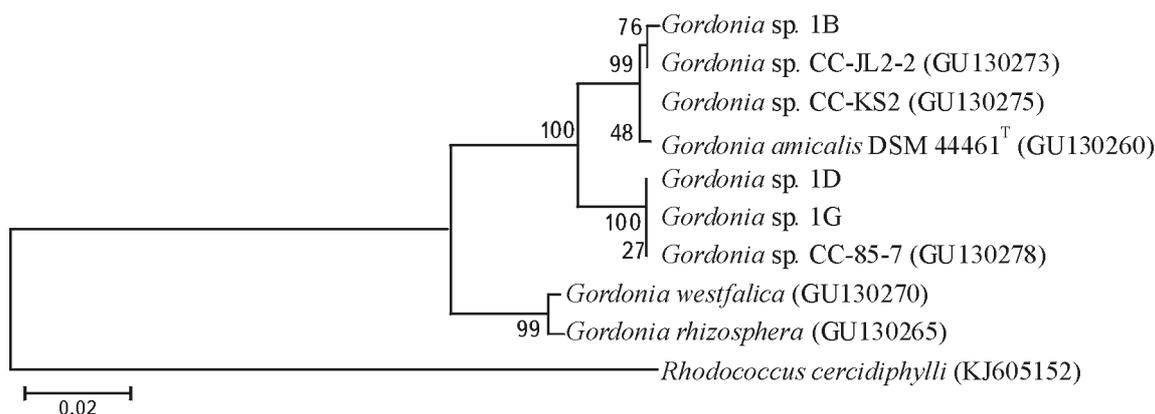


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена *alkB* и показывающее положение штаммов 1B, 1D и 1G среди близкородственных штаммов р. *Gordonia*

Fig. 1. A phylogenetic tree created on the basis of the analysis of the *alkB* gene nucleotide sequences that demonstrates the position of the 1B, 1D and 1G strains among closely related strains of the *Gordonia* genus

[21]. При секвенировании генов *alkB* были получены последовательности длиной от 480 до 510 п.н.

Штаммы 1B, 1D и 1G были выделены из одного образца (почва из шламонакопителя, Москва); однако анализ гена *alkB*, а также приведенные далее физиологические характеристики штаммов свидетельствуют, что они не являются субклонами. Штамм 1B входит в один кластер с типовым штаммом *G. amicalis*, а штаммы *Gordonia* sp. 1D и *Gordonia* sp. 1G находятся в другом кластере (рис. 1). Учитывая уровень сходства последовательностей гена *alkB* у типовых штаммов р. *Gordonia* [21], штамм 1B идентифицирован как *G. amicalis*, а штаммы 1D и 1G представляют, возможно, новый

вид данного рода. Филогенетические деревья строили по алгоритмам Neighbor Joining и Maximum Parsimony; показано, что вне зависимости от алгоритма штамм 1B (номер последовательности *alkB* в GenBank KT862535) находится в отдельном от 1D и 1G кластере.

Отдельный видовой статус штамма *Gordonia* sp. 1D подтверждается и данными анализа гена *gyrB*. Уровень сходства между *Gordonia* sp. 1D и типовым штаммом *G. amicalis* по гену *gyrB* составляет 92,2%, что не позволяет, несмотря на близость на филогенетическом дереве по гену *gyrB*, однозначно отнести штамм 1D к виду *G. amicalis* (рис. 2).

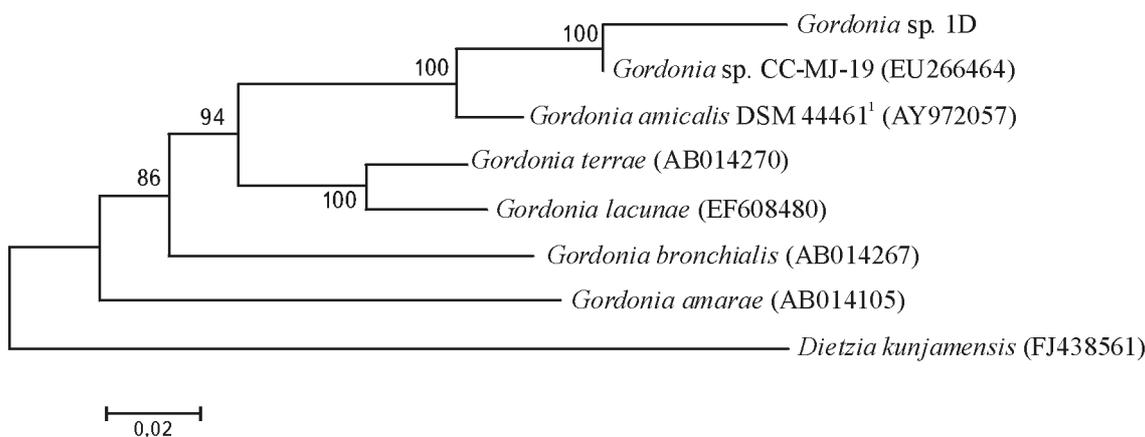


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена *gyrB* и показывающее положение штамма 1D среди близкородственных штаммов р. *Gordonia*

Fig. 2. A phylogenetic tree created on the basis of the analysis of the *gyrB* gene nucleotide sequences that demonstrates the position of the 1D strain among closely related strains of the *Gordonia* genus

Среди термотолерантных штаммов, близких по данным анализа 16S рРНК к *Rhodococcus erythropolis*, степень гомологии по последовательностям гена *gyrB* составляет от 94,0% до 99,7%. Таксономическая ревизия *R. jialingiae* и *R. qingshengii* [24], двух близких видов к виду *R. erythropolis*, позволяет классифицировать уровень сходства между ними по гену *gyrB* (около 95% и ниже) как межвидовой. По данным анализа *gyrB*, штамм Par6 (99,5% гомологии) идентифицирован как *R. erythropolis*, а остальные 3 упомянутых выше штамма могут представлять новый вид или виды в составе р. *Rhodococcus*.

Штаммы 8А-3А и А2-6 по результатам анализа последовательности гена 16S рРНК определены соответственно как *Rhodococcus* sp. и *Deinococcus* sp. Последовательности генов 16S рРНК штаммов L5A-BSU и AL-18 были близки к последовательностям этого гена у типового штамма *R. pyridinivorans*. Кроме того, штаммы утилизировали пиридин в качестве единственного источника углерода, что позволило определить их как *R. pyridinivorans* на основании способности к росту на маркерном субстрате.

Таким образом, большинство исследуемых термотолерантных бактерий относятся к родам *Gordonia* и *Rhodococcus*. Представители обоих родов являются распространенными мезофильными нефтедеструкторами, однако о способности представителей видов *G. amicalis* и *R. erythropolis*

утилизировать углеводороды при температуре выше 40° ранее не сообщалось.

Анализ способности штаммов утилизировать нефть в модельных системах при различных температурах и составление консорциумов термотолерантных бактерий

При первичном скрининге с целью отбора наиболее эффективных бактерий 11 термотолерантных штаммов культивировали в жидкой минеральной среде с нефтью в течение 14 сут при температуре 24° и 45°. По окончании эксперимента измеряли остаточную концентрацию нефти в среде культивирования и оценивали степень ее бактериальной деструкции за вычетом абиотической убыли. Наиболее активно этот процесс осуществляли штаммы *Gordonia* sp. 1D (55% и 25% нефти при 24° и 45°, соответственно), *R. pyridinivorans* L5A-BSU (19% и 27%, соответственно) и *Rhodococcus* sp. Par7 (24% и 20%, соответственно). Абиотическая потеря нефти при 24° и 45° составила 6% и 11%, соответственно (рис. 3).

Таким образом, по результатам оценки степени микробной деструкции нефти были отобраны штаммы — эффективные термотолерантные деструкторы нефти: *Gordonia* sp. 1D, *Rhodococcus* sp. Par7, *R. pyridinivorans* L5A-BSU, *Deinococcus* sp. A2-6, *Gordonia* sp. 1G, *Rhodococcus* sp. Par6. Из

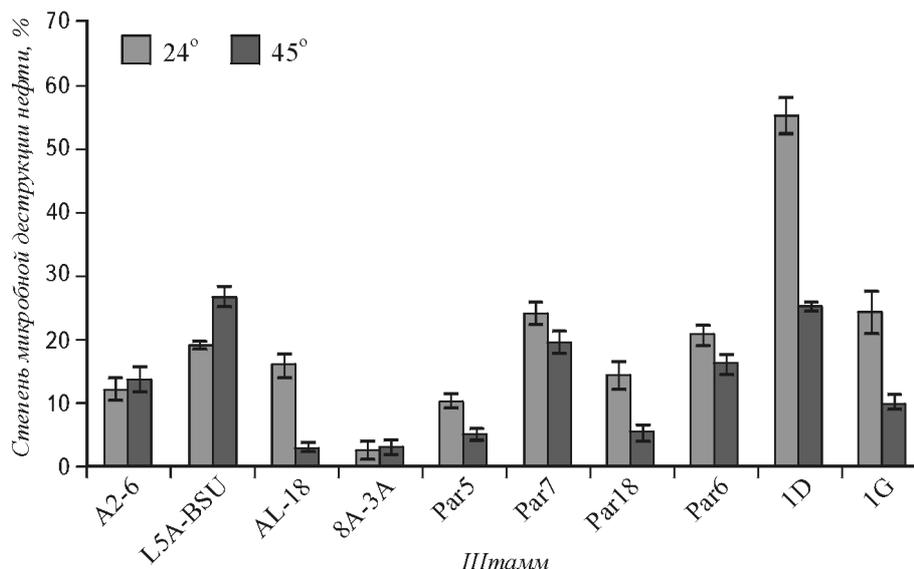


Рис. 3. Степень деструкции нефти термотолерантными штаммами в жидкой среде за 14 сут при температуре 24° и 45° (за вычетом абиотической убыли)

Fig. 3. Rate of oil destruction by thermotolerant strains in liquid medium for 14 days at 24°C and 45°C (minus abiotic losses). (Y axis, oil degradation degree, %; X axis, strain)

Состав консорциумов для биодеструкции нефти на основе термотолерантных бактерий
Composition of consortia on the basis of thermotolerant bacteria for oil biodestruction

Консорциум А Consortium A	Консорциум Б Consortium B	Консорциум В Consortium C	Консорциум Г Consortium D
<i>R. pyridinivorans</i> L5A-BSU <i>Gordonia</i> sp. 1G <i>Gordonia</i> sp.1D	<i>Rhodococcus</i> sp. Par6 <i>Deinococcus</i> sp. A2-6 <i>Gordonia</i> sp.1D	<i>Rhodococcus</i> sp. Par7 <i>R. pyridinivorans</i> L5A-BSU <i>Gordonia</i> sp.1D	<i>Deinococcus</i> sp. A2-6 <i>Rhodococcus</i> sp. Par7 <i>Gordonia</i> sp.1D

них было составлено 4 различных консорциума (табл. 3).

При составлении консорциумов учитывали физиологические особенности штаммов, в частности, спектр окисляемых субстратов. Консорциумы составляли таким образом, чтобы в них присутствовали деструкторы как алканов, так и ароматических соединений. Например, в состав консорциума В входят штаммы *Gordonia* sp. 1D и *Rhodococcus* sp. Par7, утилизирующие широкий спектр линейных алканов, а также деструктор полиароматических соединений *R. pyridinivorans* L5A-BSU. Подобранные таким образом консорциумы утилизируют максимально широкий спектр компонентов нефти, а составляющие их бактерии не конкурируют за доступные субстраты.

Для изучения процесса деструкции нефти и сравнения его эффективности консорциумы культивировали в жидкой минеральной среде, содержащей 2% нефти и 3% соли в течение 14 сут. Деградационную активность бактерий оценивали по суммарному показателю убыли нефти в жидкой среде. Абиотические потери нефти составляли 5% и 12%, соответственно, при 24° и 45°. Наибольшую степень деструкции нефти наблюдали в системе с консорциумом В (рис. 4): 68% нефти при 24° и 40% нефти при 45°. Таким образом, наиболее эффективным сочетанием микроорганизмов для консорциума как основы биопрепарата термотолерантных нефтедеструкторов являлся вариант В (*Rhodococcus* sp. Par7, *R. pyridinivorans* L5A-BSU и *Gordonia* sp. 1D). Штаммы консорциума депони-

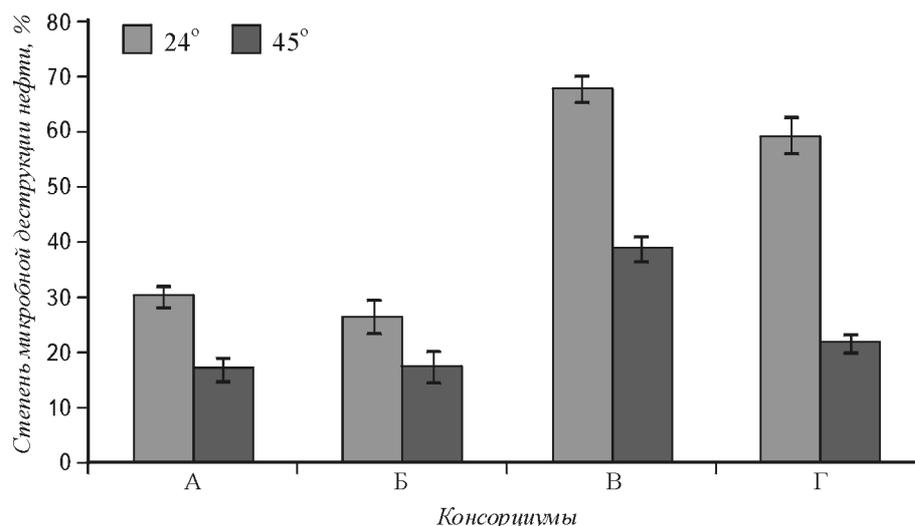


Рис. 4. Степень деструкции нефти составленными консорциумами термотолерантных бактерий в жидкой минеральной среде за 14 сут при температуре 24° и 45° (за вычетом абиотической убыли)

Fig. 4. Rate of oil destruction by composed consortia of thermotolerant bacteria in liquid mineral medium for 14 days at 24°C and 45°C (minus abiotic losses). (Y axis, oil degradation degree, %; X axis, consortium)

рованы во Всероссийской Коллекции Микроорганизмов под следующими номерами: *Gordonia* sp. 1D — ВКМ Ас-2720 Д, *Rhodococcus* sp. Par7 — ВКМ Ас-2722 Д и *R. pyridinivorans* L5A-BSU — ВКМ Ас-2721 Д.

Эффективность деградации нефти консорциумом термотолерантных штаммов в грунте

Для оценки эффективности отобранных термотолерантных штаммов и консорциума в грунте в условиях жаркого климата была использована модель загрязненной почвы (см. раздел «Условия эксперимента») со следующими характеристиками: содержание нефти — 2%, содержание соли — 3%, влажность — 10%. Инокулят вносили до конечной концентрации 10^4 КОЕ/г грунта. Эксперимент проводили как при 24°, так и при 45°. По окончании эксперимента измеряли остаточную концентрацию углеводов и абиотическую убыль в системах без микроорганизмов методом ИК-спектрометрии. Последняя составила 20% и 33%, соответственно, через 21 сут при температуре 24° и 45°.

В процессе деструкции нефти в грунте консорциумом было утилизировано 70% и 59% нефти (при температуре 24° и 45°, соответственно) (рис. 5), что значительно превышает данные, полученные для индивидуальных штаммов.

Степень утилизации нефти в грунте индивидуальными штаммами при 24° и 45° составила соответственно 45% и 40% для *Gordonia* sp. 1D, 32% и 38% для *R. pyridinivorans* L5A-BSU и 34% и 29% для *R. erythropolis* Par7. Таким образом, использование этих штаммов совместно в составе консорциума значительно повышает эффективность деструкции нефти как в жидкой минеральной среде, так и в грунте.

Оценка стабильности консорциума при 24° и 45° в жидкой минеральной среде с нефтью

Динамику численности микроорганизмов консорциума В изучали как при умеренной (24°), так и при повышенной (45°) температуре в жидкой среде Эванса с 2% нефти и 3% соли в течение 25 сут. Посевная доза каждого штамма составляла 10^5 КОЕ/мл. Штаммы вносили в соотношении 1:1:1. Бактерии, внесенные в систему в одинаковой исходной концентрации, демонстрировали различную скорость роста. Так, при 24° у штамма Par7 экспоненциальная фаза начиналась уже на 3-и сутки роста. У штамма L5A-BSU в первые 72 ч культивирования при 24° отмечали падение численности на порядок относительно исходной концентрации, после чего начиналась фаза логарифмического роста. Логарифмический рост родококков прекращался практически одновременно на 7-е сутки роста, после чего в ходе эксперимента

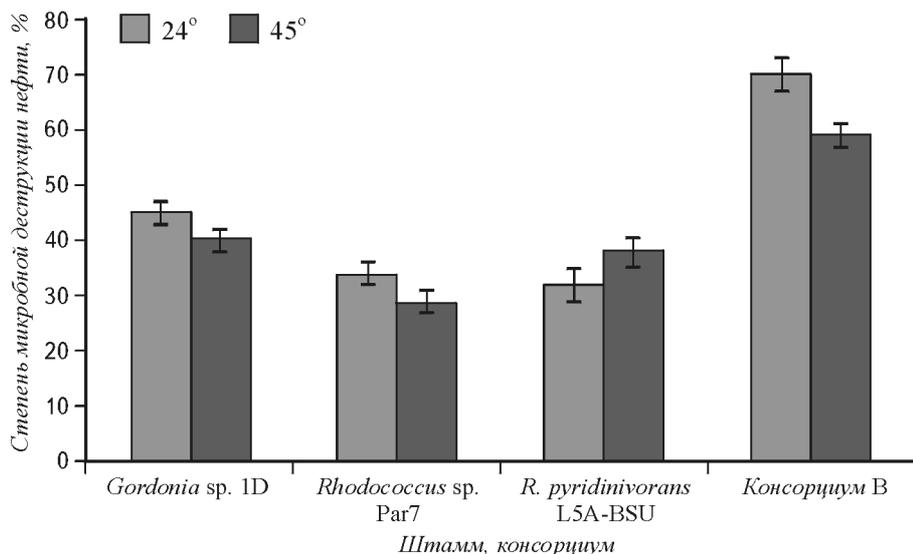


Рис. 5. Степень деструкции нефти за 21 сут индивидуальными штаммами 1D, Par7 и L5A-BSU и их консорциумом (консорциум В) в грунте, изначально загрязненном 2% нефти и 3% соли, при влажности 10% и температуре 24° или 45°

Fig. 5. Rate of oil destruction by individual strains and a composed consortium (Consortium B) of thermotolerant bacteria in soil initially contaminated by 2% oil and 3% saline at humidity of 10% and 24°C or 45°C for 21 days (minus abiotic losses). (Y axis, oil degradation degree, %; X axis, strain or consortium)

наблюдали периоды стабилизации численности, падения и вторичного роста.

Ростовые характеристики культуры штамма *Gordonia* sp. 1D в составе консорциума В отличались от характеристик культур родококков. Штамм демонстрировал долгий период лаг-фазы (5 сут), когда его численность, упавшая относительно исходной на половину порядка, не изменялась. По окончании 5 сут штамм 1D переходил в логарифмическую фазу роста, которая заканчивалась к 200-му часу роста. Тем не менее, численность штамма продолжала расти, и окончательную стабилизацию наблюдали через 250 ч после начала культивирования. После этого штамм *Gordonia* sp. 1D, как и остальные штаммы консорциума, демонстрировал непродолжительные периоды падения численности и вторичного роста.

На момент окончания эксперимента (25-е сутки) при 24° численность штаммов в консорциуме была примерно одинаковой и составляла $3 \cdot 10^6$ КОЕ/мл для штамма *R. pyridinivorans* L5A-BSU, $1 \cdot 10^6$ КОЕ/мл для *R. erythropolis* Par7 и $2 \cdot 10^6$ КОЕ/мл для *Gordonia* sp. 1D. Таким образом, консорциум, составленный из трех штаммов термотолерантных бактерий, демонстрировал стабильность состава на протяжении как минимум 25 сут. Штаммы не проявляли взаимного антагонизма, длительность фаз их развития в смешанной культуре почти не отличалась от таковой в индивидуальной культуре.

Кинетика численности трех штаммов в смешанной культуре при 45° была иной, чем при 24°. При повышенной температуре для родококков была характерна более долгая лаг-фаза (около 5 сут). Что касается гординии, то время ее перехода в фазу экспоненциального роста не изменилось по сравнению с ростом при 24°. По окончании экспоненциальной фазы штаммы Par7, 1D и L5A-BSU достигали численности соответственно $2 \cdot 10^7$, $3 \cdot 10^7$ и $2,4 \cdot 10^7$ КОЕ/мл при начальной концентрации каждого из них $1 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. После этого в системе наблюдали стабилизацию численности всех трех культур с последующим медленным падением количества жизнеспособных клеток. На 25-е сутки роста численность штаммов консорциума составляла $2 \cdot 10^5$, $3 \cdot 10^5$, $3,2 \cdot 10^5$ КОЕ/мл для штаммов Par7, 1D и L5A-BSU, соответственно. Из полученных данных можно заключить, что несмотря на колебания в процессе развития смешанной культуры, численность клеток в определенный момент времени стабилизируется и все штаммы консорциума растут, не подавляя друг друга. Интересно отметить, что несмотря на достаточно

близкое родство входящих в консорциум штаммов они не проявляют взаимного антагонизма; наоборот, одновременное их присутствие в нефтезагрязненной системе повышает эффективность очистки. Такой результат может быть связан с тем, что субстратами трех штаммов являются разные компоненты нефти и это обеспечивает отсутствие конкуренции за доступные субстраты.

Анализ информации о разработанных на территории России и стран СНГ биопрепаратах для деструкции нефти и проведенный патентный поиск показали, что максимальная рабочая температура для микроорганизмов, входящих в эти препараты, не превышает 40—42° [25—27]. В настоящей работе впервые предложен консорциум термотолерантных актиномицетов, осуществляющий эффективную деструкцию нефти не только при умеренной, но также при повышенной (до 50°) температуре. Поскольку аналогичных разработок патентный поиск не выявил, была подана заявка на изобретение на патент РФ [28].

Известно, что оптимальное содержание воды в почве для большинства нефтеокисляющих микроорганизмов определяется влажностью 30—60% [29, 30]. Так например, для препарата Микрозим Петротрит (разработка РСЭ «Трейдинг»), представленного сочетанием 12 микроорганизмов 5 родов и также способного разлагать углеводороды при повышенной (40—45°) температуре, влажность грунта должна быть не менее 30%. Однако при температуре окружающей среды выше 40° на поддержание такой влажности требуется большой расход воды.

Среди средств, разработанных за пределами России с целью удаления нефти из окружающей среды, можно отметить препарат с условным названием Микотрих и его более позднюю модификацию [31, 32], созданные для очистки почвогрунтов и нефтешламов в Казахстане. В состав данного препарата входят бактерии *Mycobacterium thermoresistibile* 119-3ГМ, *Rhodococcus equi* 51КС и дрожжи *Trichosporon cutaneum* P20CO2 в соотношении 1:1:1. Особенностью препарата является способность микроорганизмов в его составе утилизировать высокие (около 70%) концентрации нефти. Однако испытания Микотриха были проведены при температуре не выше 35°, а данные о минимально допустимой влажности и допустимой солености среды отсутствуют.

Таким образом, предложенный в данной работе консорциум эффективно утилизирует нефть при низкой влажности грунта (10%), что соответствует среднему значению влажности почв и грунтов полупустынь. Эффективность бактериально-

го консорциума в грунте при низких показателях его влажности показана впервые. Биопрепарат на основе консорциума термотолерантных актиномицетов перспективен для применения в засоленных (до 7%) водах и грунтах, а также в условиях низкой влажности грунта (10%) при температуре до 50°. Данная разработка может быть использована для очистки нефтезагрязненных грунтов и вод на территории России и других стран, расположенных в регионах с жарким климатом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект Бел_а № 14-04-90030).

The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR, Project Bel_a N 14-04-90030).

Получено 9.12.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Chibuike, G.U. Bioremediation of hydrocarbon-polluted soils for improved crop performance / G.U. Chibuike, S.C. Obiora // Int. J. Environ. Sci. — 2014. — V. 4. — N 5. — P. 840—858.
2. Hamed, M.M. Screening level modeling of long-term impact of petroleum hydrocarbon contamination on fresh groundwater lenses in the Arabian Gulf Region // Environ. Model. Assessment. — 2004. — V. 9. — P. 253—264.
3. Tolosa, I. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine biota and coastal sediments from the Gulf and the Gulf of Oman / I. Tolosa, S.J. de Mora, S.W. Fowler, J.-P. Villeneuve, J. C. Bartocci Cattini // Mar. Pollut. Bull. — 2005. — V. 50. — P. 1619—1633.
4. Mills, S.A. Evaluation of phosphorus sources promoting bioremediation of diesel fuel in soil / S.A. Mills, W.T. Frankenberg Jr // Bull. Environ. Contam. Toxicol. — 1994. — V. 53. — P. 280—284.
5. Agarry, S.E. Bioremediation of soil artificially contaminated with petroleum hydrocarbon mixtures: Evaluation of the use of animal manure and chemical fertilizer / S.E. Agarry, C.N. Owabor, R.O. Yusuf // Bioremed. J. — 2010. — V. 14. — N 4. — P. 189—195.
6. Куликова И.Ю. Биопрепарат на основе углеводородоксилирующего штамма *Phyllobacterium myrsinacearum* DKS-1 для восстановления нефтезагрязненных морских акваторий // Вода: химия и экология. — 2011. — № 7. — С. 59—64.
Kulikova, I.Yu. Biopreparation of the basis of Hydrocarbon-Oxidizing Strain of *Phyllobacterium myrsinacearum* DKS-1 for Remediation of Oil-Polluted Sea Water Area // Voda: Khimiya i Ecologiya (Water: Chemistry and Ecology) — 2011. — N 7. — P. 59—64.
7. Стабникова Е.В. Применение биопрепарата “Лестан” для очистки почвы от углеводородов нефти / Е.В. Стабникова, М.В. Селезнева, А.Н. Дульгеров, В.Н. Иванов // Приклад. биохим. микробиол. — 1996. — Т. 32. — № 2. — С. 219—223.
Stabnikova, E.V. Application of a Biopreparation Lestan to Soil Remediation from Petroleum Hydrocarbons / E.V. Stabnikova, M.V. Selezneva, A.N. Dul'gerov, and V.N. Ivanov // Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya (Applied Biochemistry and Microbiology). — 1996. — V. 32. — N 2. — P. 219—223.
8. Яненко А.С., Аракелян Э.И., Герасимова Т.В., Губанова Т.А., Кирсанов Н.Б., Казаков А.Г., Ларилова Г.А., Полякова И.Н., Пауков В.Н., Цыганков Ю.Д. Способ очистки воды и почвы от нефтяных загрязнений // Патент РФ 2039714, С 12 N 1/20 С 12 R1. 1993.
Yanenko, A.S., Arakelyan, E.I., Gerasimova, T.V., Gubanova, T.A., Kirsanov, N.B., Kazakov, A.G., Larikova, G.A., Polyakova, I.N., Paukov, V.N., and Tsygankov, Yu.D. A Method for Decontamination of Water and Soil from Oil Pollution // Patent of RF 2039714, C 12 N 1/20, C 12 R 1. 1993.
9. Белонин М.Д., Rogozina Е.А., Свечина Р.М., Хотянович А.В., Орлова Н.А. Биопрепарат для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов // Патент РФ 2053206, С 02 F3/34, С 09 К 3/32, В 09 С 1/10, В 09 С 101:00. 1994.
Belonin, M.D., Rogozina, E.A., Svechina, R.M., Khotianovich, A.V., and Orlova, N.A. Biopreparation for Decontamination of Water and Soil from Oil and Petroleum Products // Patent of RF 2053206, C 02 F3/34, C 09 K 3/32, B 09 C 1/10, B 09 C 101:00. 1994.
10. Орлова Н.А., Rogozina Е.А., Свечина Р.М. Биопрепарат для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов // Патент РФ 2428469, С 12 N 1/20 (2006.01), С 02 F 3/34 (2006.01), С 09 К 3/32 (2006.01), В 09 С 1/10 (2006.01). 2010.
Orlova, N.A., Rogozina, E.A., and Svechina, R.M., Biopreparation for Decontamination of Water and Soil from Oil and Petroleum Products // Patent of RF 2428469, C 12 N 1/20 (2006.01), C 02 F 3/34 (2006.01), C 09 K 3/32 (2006.01), B 09 C 1/10 (2006.01). 2010.
11. Foght, J.M. Effect of nitrogen source on biodegradation of crude oil by a defined bacterial consortium incubated under cold, marine conditions / J.M. Foght, K. Semple, C. Gauthier, D.W.S. Wetlake, S. Blenkinsopp, Z. Wang, M. Fingas // Environ. Technol. — 1999b. — V. 20. — P. 839—849.
12. Komukai-Nakamura, S.K. Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude oil / S.K. Komukai-Nakamura, T.H. Yamauchi, Y. Inomata, K. Venkateswaran, T.H.S. Yamamoto, S. Harayama // J. Ferment. Bioeng. — 1996. — V. 82. — P. 570—574.
13. Malik, Z.A. Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium / Z.A. Malik, S. Ahmed // African J. Biotechnol. — 2012. — V. 11. — N 3. — P. 650—658.
14. Evans, C.G.T., Herbet, D., Tempest, D.W. The continuous culture of microorganisms 2. Construction of a chemostat: Methods in microbiology. V.2. [Eds. J.R. Norris, D.W. Ribbons]. — London: Acad. Press, 1970. — P. 277—327.
15. Miller, J.H. Experiments in Molecular Biology — N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972. — P. 431—433.
16. Bertani, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* // J. Bacteriol. — 1951. — V. 62. — P. 293—300.

17. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Struhl, K. Current protocols in molecular biology. — N.Y.: John Wiley & Sons, 2003. — P. 180—183.
18. Страдомская А.Г., Боева Л.Г., Рязанцева И.А. Массовая концентрация нефтепродуктов в водах. Методика выполнения измерений ИК-фотометрическим методом. РД 52.24.476-2007. — Ростов-на-Дону: Гидрохимический институт, 2007. — 33 с.
Starodomskaia, A.G., Boeva, L.G., and Riazantseva, I.A. Mass concentration of petroleum products in water. Protocol for measurements by IR photometry. RD 52.24.476-2007. — Rostov-on-Don: Hydrochemical Institute, 2007. — 33 p.
19. Marchesi, J.R. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA / J.R. Marchesi, T. Sato, A. Weightman, T. Martin, J.C. Fry, S.J. Hiom, W.G. Wade // Appl. Environ. Microbiol. — 1998. — V. 64. — N 2. — P. 795—799.
20. Yamamoto, S. PCR Amplification and Direct Sequencing of *gyrB* Genes with Universal Primers and Their Application to the Detection and Taxonomic Analysis of *Pseudomonas putida* Strains / S. Yamamoto, S. Harayama // Appl. Environ. Microbiol. — 1995. — V. 61. — N 3. — P. 1104—1109.
21. Shen, F.T. Molecular detection and phylogenetic analysis of the alkane 1-monoxygenase gene from *Gordonia* ssp. / F.T. Shen, L.S. Young, M.F. Hsieh, S.Y. Lin, C.C. Young // System. Appl. Microbiol. — 2010. — V. 33. — P. 53—59.
22. Shen, F.T. Phylogenetic analysis of members of the metabolically diverse genus *Gordonia* based on proteins encoding the *gyrB* gene / F.T. Shen, H.L. Lu, J.L. Lin, W.S. Huang, A.B. Arun, C.C. Young // Res. Microbiol. — 2006. — V. 157. — P. 367—375.
23. Shen, F.T. Molecular detection and phylogenetic analysis of the catechol 1,2-dioxygenase gene from *Gordonia* ssp. / F.T. Shen, J.L. Lin, C.C. Huang, Y.N. Ho, A.B. Arun, L.S. Young, C.C. Young // System. Appl. Microbiol. — 2009. — V. 32. — P. 291—300.
24. Tancsics, A. Sequence analysis of 16S rRNA, *gyrB* and *catA* genes and DNA—DNA hybridization reveal that *Rhodococcus jialingiae* is a later synonym of *Rhodococcus qingshengii* / A. Tancsics, T. Benedek, M. Farkas, I. Mathe, K. Marialigeti, S. Szoboszlai, J. Kukolya, B. Kriszt // Intern. J. System. Evolut. Microbiol. — 2014. — V. 64. — P. 298—301.
25. Биттеева М.Б., Мурзаков Б.Г., Морщачкова Г.Н., Хамроев О.Ж., Капотина Л.Н., Фадеева Т.Н., Помазкова В.А., Левандовская Ю.Б., Демидова Е.И., Поспелов М.Е. Способ очистки воды и почвы от нефтепродуктов // Патент РФ 2014286, С 02 F 3/34, Е 02 В 15/04. 1994.
Bitteeva, M.B., Murzakov, B.G., Morshchakova, G.N., Khamrov, O.Zh., Kapotina, L.N., Fadeeva, T.N., Pomazkova, V.A., Levandovskaya Yu.B., Demidova, E.I., and Pospelov, M.E. A Method for Decontamination of Water and Soil from Petroleum Products // Patent of RF 2014286, С 02 F 3/34, Е 02 В 15/04. 1994.
26. Карасева Э.В., Самков А.А., Худокормов А.А., Карасев С.Г., Волченко Н.Н. Биопрепарат для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов // Патент РФ 2365438, В 09 С 1/10, С 02 F 3/34, С 12 N 1/26. 2006.
Karaseva, E.V., Samkov, A.A., Khudokormov, A.A., Karasev, S.G., and Volchenko, N.N. A Biopreparation for Decontamination of Water and Soil from Oil and Petroleum Products // Patent of RF 2365438, В 09 С 1/10, С 02 F 3/34, С 12 N 1/26. 2006.
27. Алексеев А.Ю., Беднаржевский С.С., Забелин В.А., Комкова А.В., Пушкарев Н.С., Рассадкин Ю.Н., Шевченко Н.Г., Шестопалов А.М. Препарат для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов // Патент РФ 2337069, С 02 F 3/34, В 09 С 1/10, С 12 N 1/26. 2007.
Alekseev, A.Yu., Bednarzhevskii, S.S., Zabelin, V.A., Komkova, A.V., Pushkarev, N.S., Rassadkin, Yu.N., Shevchenko, N.G., and Shestopalov, A.M. A Biopreparation for Decontamination of Water and Soil from Oil and Petroleum Products // Patent of RF 2337069, С 02 F 3/34, В 09 С 1/10, С 12 N 1/26. 2007.
28. Делеган Я.А., Ветрова А.А., Иванова А.А., Чернявская М.И., Титок М.А., Филонов А.Е., Боронин А.М. Консорциум термотолерантных бактериальных штаммов для деградации нефти и нефтепродуктов в грунтах и водах в условиях жаркого климата // Заявка на патент РФ 2015143402. 2015.
Delegan, Ya.A., Vetrova, A.A., Ivanova, A.A., Cherniavskaya, M.I., Titok, M.A., Filonov, A.E., and Boronin, A.M. A Consortium of Thermotolerant Bacteria Strains for Oil and Petroleum Product Degradation in Soils and Water in Hot-Climate Area // Application Claim of RF 2015143402. 2015.
29. Sims, J.L. Approach to bioremediation of contaminated soil / J.L. Sims, R.C. Sims, J.E. Matthews // Hazardous Waste and Materials. — 1990. — V. 7. — P. 117—149.
30. Мокеева А.В. Ассоциация штаммов бактерий-нефтедеструкторов для ремедиации нефтезагрязненных территорий / А.В. Мокеева, А.Ю. Алексеев, Е.К. Емельянова, В.А. Забелин, А.В. Заушинцева, А.С. Тараканова, А.М. Шестопалов, Т.Н. Ильичева // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. — 2011. — Т. 9. — В. 3. — С. 27—33.
Mokeyeva, A.V. Association of Bacteria Strain-Destructors for Remediation of Oil-Polluted Territories / A.V. Mokeyeva, A.Yu. Alekseev, E.K. Emelianova, V.A. Zabelin, A.V. Zaushintseva, A.S. Tarakanova, A.M. Shestopalov, and T.N. Il'icheva // Vestnik NGU (J. of Novosibirsk State University). Series: Biology, Clinical Medicine. — 2011. — V. 9. — Issue. 3. — P. 27—33.
31. Шигаева М.Х., Мукашева Т.Д., Сыдыкбекова Р.К., Берзанова Р.Ж. Биопрепарат для очистки от нефти нефтезагрязненных экосистем // Патент KZ 19425, В 09 С 1/10, С 02 F 3/34. 2010.
Shigaeva, M.A., Mukasheva, T.D., Sydykbekova, R.K., and Berzanova, R.Zh. Biopreparation for Decontamination of Oil-Polluted Ecosystems from Oil // Patent of KZ 19425, В 09 С 1/10, С 02 F 3/34. 2010.
32. Шигаева М.Х., Мукашева Т.Д., Сыдыкбекова Р.К., Берзанова Р.Ж., Даутова Д.Б. Микробный препарат для очистки почвогрунтов и нефтешламов // Патент KZ 26078, С 12 N 1/20, В 09 С 1/10, С 02 F 3/34. 2012.
Shigaeva, M.A., Mukasheva, T.D., Sydykbekova, R.K., Berzanova, R.Zh. and Dautova, D.B., A Microbial Preparation for Decontamination of Soils and Oil Cakes // Patent of KZ 26078, С 12 N 1/20, В 09 С 1/10, С 02 F 3/34. 2012.

Ya.A. DELEGAN^{1,2}, A.A. VETROVA², M.A. TITOK³,
and A.E. FILONOV^{1,2,*}

¹The Pushchino State Natural-Science Institute, 142290, Pushchino, Moskovskaya oblast Russia

²The Skryabin Institute for Biochemistry and Physiology of Microorganisms, 142290, Pushchino, Moskovskaya oblast Russia

³The Belorussian State University, 220030, Minsk Belarus

e-mail: filonov.andrey@rambler.ru

Design of a Consortium of Thermotolerant Bacteria as a Basis for a Biopreparation to Remediate Oil-Contaminated Soils and Water on Territories with Hot Climate

For the first time, the bacterial consortium consisting of thermotolerant oil-destructing strains of *Gordonia* sp. 1D VKM Ac-2720 D, *Rhodococcus* sp. Par7 VKM Ac-2722 D and *R. pyri-*

dinivorans L5A-BSU VKM Ac-2721 D for the petroleum destruction in soils and water in the hot climate regions has been designed. The consortium is effective in soils and water at the temperatures up to 50°C, medium salinity up to 7% and humidity about 10%. For instance, the efficiency of the oil degradation in model soil was 70% and 59% for 21 days at 24°C and 45°C, respectively. The association of the thermotolerant oil degrader strains can be used as a basis for a biopreparation for remediation of oil-polluted soils and water in the hot climate regions.

Key words: biodegradation, bioremediation, consortium, hot climate, petroleum, thermotolerant bacteria.

Biotekhnologiya (Biotechnology), 2016, V. 32, N 1, P.53—64.

* Author for correspondence.