

УДК 579.68

Оценка деградационного потенциала нефтеокисляющих микроорганизмов Балтийского моря в модельных микрокосмах

© 2017 г. С.Л. СОКОЛОВ*, О.И. САЗОНОВА, А.Б. ГАФАРОВ, А.А. ИВАНОВА, А.А. ВЕТРОВА, Н.В. ПРИСЯЖНАЯ, И.А. КОШЕЛЕВА, А.М. БОРОНИН

ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина» Российской академии наук, Пущино, Московская область, 142290

*e-mail: sls@ibpm.pushchino.ru**

Поступила 10.11.2016 г.

Принята в печать 26.12.2016 г.

Исследована способность к деградации нефти у бактериопланктона Балтийского моря в модельных системах с водой и седиментами Финского залива. Изолированы и идентифицированы микроорганизмы, разрушающие нефть, дизельное топливо, фенантрен, нафталин и БТЭК. Внесение в модельные системы шести отобранных микроорганизмов-деструкторов (с широким спектром субстратной специфичности) увеличивает потенциал аборигенного микробного сообщества в отношении деградации углеводов нефти. Убыль нефти происходила в летних пробах как с интродуцированными микроорганизмами, так и без их внесения, однако наиболее интенсивная деградация была характерна для проб, содержащих внесенную микрофлору. Подсчитан коэффициент относительной нефтеокисляющей активности для всех модельных систем. Установлено, что зимняя проба, содержащая аборигенную ассоциацию микроорганизмов без специально внесенных в нее штаммов-деструкторов, характеризуется наибольшей относительной нефтеокисляющей активностью.

Ключевые слова: биодegradация, лабораторные модельные системы, микроорганизмы-деструкторы, углеводороды нефти.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-4-76-84

Сырая нефть и нефтепродукты содержат значительное количество алкановых и ароматических углеводов, большинство из которых токсичны для живых организмов и в долгосрочной перспективе могут вызвать их интоксикацию, клеточные повреждения и нарушения развития. Объемы перевозки нефтепродуктов, как и темпы судоходства, все время возрастают; соответственно, и риск аварийного разлива нефти при ее транспортировке через акватории также растет.

Ликвидация нефтяных разливов на море ставит перед собой цель не только уменьшить экологический ущерб, но и снизить социально-экономические

последствия загрязнения акватории. Микробная ремедиация загрязненных углеводородами почв является доступным и экологически безопасным методом очистки окружающей среды, поэтому желательна разработка подобных технологий и для морских экосистем. Для этих целей сначала необходимо оценить природный биодegradативный потенциал находящихся в воде аборигенных микроорганизмов-деструкторов и возможность их использования для ускорения процессов биодegradации.

Балтийское море характеризуется большим объемом впадающей речной воды, что делает его менее соленым по сравнению с другими морями.

Список сокращений: БТЭК – смесь бензола, толуола, этилбензола и ксилолов в равном соотношении; ДТ – дизельное топливо; КОЕ – колониобразующая единица; ПЦР – полимеразная цепная реакция; Hd – гексадекан; Nah – нафталин; Phn – фенантрен; Tol – толуол.

Микробное сообщество Балтийского моря – это уникальная комбинация морских и пресноводных микробных популяций, специфичных для данной акватории [1]. Эксперименты в микрокосмах по влиянию нефти на изменения в структуре микробных сообществ Балтийского моря проводились в Эстонии. В зависимости от концентрации и типа нефти (сырая или сланцевая) в микрокосмах формировались различные микробные сообщества [2]. Группа финских исследователей проводила эксперименты по моделированию аварийного разлива нефти в объемных мезокосмах с водой Балтийского моря [3]. Для отработки технологии биоремедиации авторы вносили микробный инокулят, выращенный на среде с дизельным топливом и растительным сорбентом. Однако оценка природного микробного биodeградативного потенциала в отношении углеводов нефти проведена не была.

Цель работы – исследование способности бактериопланктона и бентоса Балтийского моря к разрушению нефти и нефтепродуктов в модельных лабораторных системах (микрокосмах).

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Отбор проб

Образцы воды и седиментов Балтийского моря отбирали в летний и зимний периоды в двух точках Финского залива – порт Усть-Луга (N59.676610, E28.429372) и деревня Кандикюля (N59.937182, E29.059099) в соответствии с ГОСТ 17.4.4.02-84 и ГОСТ 31862-2012. Пробы седиментов отбирали вдоль линии прибоя и помещали в стерильные пластиковые контейнеры. Морскую воду отбирали в стерильные бутылки фирмы ISOLAB (Германия) емкостью 1 л на расстоянии 1 м от берега. Температура воздуха при отборе проб в зимний период (февраль) составляла 3°C, в летний период (август) – 18°C.

Выделение и идентификация микроорганизмов-деструкторов углеводов нефти

Выделение бактериальных штаммов. Отобранные пробы использовали для изоляции микроорганизмов-деструкторов углеводов нефти методом как прямого посева, так и пролонгированного накопительного культивирования в минеральной среде, как описано ранее [4]. Для выделения бактериальных штаммов-деструкторов методом накопительных культур из проб седимен-

тов использовали минеральную среду Эванса [5]. Из воды Финского залива микроорганизмы выделяли следующим образом: пробу воды (100 мл, pH 6,0) помещали в стеклянную колбу-качалку емкостью 750 мл, добавляли источники азота (10 мМ NH₄Cl), фосфора (5 мМ фосфатный буфер), а также вносили следующие микроэлементы, г/л: ZnO – 0,41; FeCl₃ · 6H₂O – 5,4; MnCl₂ · 4H₂O – 2; CuCl₂ · 2H₂O – 0,17; CoCl₂ · 6H₂O – 0,48; H₃BO₃ – 0,06 (Panreac, Испания).

В качестве единственных источников углерода и энергии в минеральную среду добавляли один из субстратов до следующих конечных концентраций, г/л: нефть – 3, дизельное топливо (НК «Роснефть», Россия) – 5, нафталин (Sigma-Aldrich, США), фенантрен (Sigma-Aldrich) – 1 и БТЭК (Panreac) – 5. Свойства используемой нефти («Московский нефтеперерабатывающий завод») были следующие: плотность 796–831 кг/м³, содержание (в массовых долях) парафинов 2,7–4,5%, асфальтенов – 0,13–1,67%, смол – 2,1–3,2%, серы (сероводородной и меркаптановой) – 0,057–0,060% [6].

Для приготовления агаризованной среды использовали агар-агар (American type QP, Panreac). Нафталин и фенантрен добавляли на крышку перевернутой чашки Петри, а дизельное топливо и БТЭК наливали в силиконовые трубки, которые также помещали на крышку перевернутой чашки Петри. Нефть добавляли в агаризованную среду и для гомогенизации полученную смесь подвергали ультразвуковой обработке при частоте 20 кГц в течение 1 мин; процедуру повторяли дважды.

В качестве полноценной питательной среды в работе использовали R2A Agar (AppliChem, Германия).

Для определения спектра утилизируемых микроорганизмами субстратов использовали метод отпечатков на агаризованной среде Эванса со следующими субстратами: нефть, дизельное топливо, нафталин, фенантрен, толуол или гексадекан (Panreac). Толуол или гексадекан также наливали в силиконовую трубку и помещали на крышку перевернутой чашки Петри. Остальные субстраты добавляли, как описано выше.

Идентификацию выделенных микроорганизмов-деструкторов проводили, используя систему MALDI Biotyper (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация), основанную на масс-спектрометрическом анализе рибосомных белков, согласно протоколу фирмы-изготовителя (Bruker Daltonics, Германия). Пробы для анализа готовили по протоколу [7].

Тотальную ДНК бактерий выделяли с использованием AxyPrep Bacterial Genomic DNA MiniPrep Kit в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя (Axygen Biosciences, США). Концентрацию ДНК определяли на флуориметре ТКО-100 (Hoefler Scientific Instruments, США) с красителем Hoechst 33258 (BioRad, США) согласно протоколу фирмы-изготовителя.

Геномный фингерпринт (ВОХА1-ПЦР) для генотипического сравнения штаммов проводили с использованием праймера ВОХА1 [8]. ПЦР осуществляли в циклере GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, США) в стандартных условиях при 50 мМ конечной концентрации дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и в присутствии 1,5 мМ MgCl₂. Электрофорез ДНК проводили в 1,2%-ном агарозном геле в 0,5-кратном трис-боратном буфере по стандартной методике

(Bio-Rad) [9]. Визуализацию ДНК осуществляли путем окрашивания геля в растворе бромистого этидия (AppliChem).

Лабораторные модельные системы

Для определения нефтеокисляющей активности выделенных штаммов-деструкторов и микробных сообществ воды и седиментов Балтийского моря использовали пять лабораторных модельных систем (микрокосмов), каждую в трех повторностях. Стандартная экспериментальная модельная система содержала нестерильную пробу воды (отобранную в летний или зимний периоды), пробу седиментов (отобранную в летний или зимний периоды) и нефть. Контрольная проба содержала те же ингредиенты, но образцы воды и песка были стерильны (табличный вывод).

№ модели

Нестерильная зимняя проба (морская вода 45 мл + 5 г песка) + смесь микроорганизмов (10 ⁶ кл/мл) + 250 мг нефти	1
Нестерильная летняя проба (морская вода 45 мл + 5 г песка) + смесь микроорганизмов (10 ⁶ кл/мл) + 250 мг нефти	2
Нестерильная зимняя проба (морская вода 45 мл + 5 г песка) + 250 мг нефти	3
Нестерильная летняя проба (морская вода 45 мл + 5 г песка) + 250 мг нефти	4
Контрольная проба: стерильный образец (морская вода 45 мл + 5 г песка) + смесь микроорганизмов (10 ⁶ кл/мл) + 250 мг нефти	5

Для оценки биodeградативной активности выделенных в ходе работы микроорганизмов в три системы (№ 1, 2 и 5) вносили смесь шести штаммов – деструкторов ароматических и алифатических соединений (табл. 1). Все изолированные штаммы-деструкторы были проверены на способность к росту на среде с нефтью, дизельным топливом, гексадеканом, фенантроном, нафталином или толуолом. Клеточные суспензии бактерий добавляли в равном соотношении в конечной

концентрации 5·10⁶ КОЕ/мл. Эксперимент проводили при комнатной температуре.

Мониторинг внесенных в микрокосм шести бактериальных штаммов проводили с использованием ВОХА1-ПЦР. Серию разведений от 10⁻¹ до 10⁻⁴ высевали на агаризованную среду Эванса с нефтью. Отдельные колонии (минимум 200) переносили на среду R2A Agar и инкубировали в течение ночи. Далее стерильной зубочисткой переносили колонию в ПЦР-пробирку с реакционной

Таблица 1

Субстратная специфичность штаммов, использованных в микрокосмах

Substrate specificity of strains used in microcosms

Штамм	Субстрат					
	Нефть	ДТ	Nah	Phn	Tol	Hd
<i>Rhodococcus</i> sp. 12	+	+	+	–	+	+
<i>Delftia</i> sp. 14	+	+	+	–	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp. 24	+	+	+	+	+	–
<i>Rhodococcus</i> sp. 28	+	+	–	–	+	+
<i>Sphingobacterium</i> sp. 33	+	–	+	+	+	–
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 63	+	+	+	–	–	–

смесью и проводили геномный фингерпринт (см. выше). В качестве контроля использовали препараты геномной ДНК этих штаммов (см. «Условия эксперимента»).

Деградиацию нефти оценивали методом ИК-спектрометрии на 7, 14 и 21-е сутки по суммарному показателю убыли в микрокосмах углеводов нефти, экстрагируемых четыреххлористым углеродом, согласно [10].

Количество колониеобразующих единиц нефтеоокисляющих микроорганизмов определяли прямым подсчетом колоний на агаризованной среде Эванса с нефтью в качестве единственного источника углерода и энергии. Число КОЕ для микрокосма № 5 определяли прямым подсчетом на среде Эванса с нефтью и на среде R2A.

Общую численность бактериальных клеток определяли в камере Горяева при помощи фазово-контрастного микроскопа Motich BA300 согласно [11].

Коэффициент относительной нефтеоокисляющей активности (Q_H), отражающий относительную скорость окисления нефти микроорганизмами, рассчитывали по следующей формуле:

$$Q_H = \frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt},$$

где dS – изменение концентрации субстрата за определенный период времени, %; dt – определенный период времени, ч.; X – изменение числа КОЕ за определенный период времени, %:

$$X = \frac{X_{t_1} - X_{t_0}}{X_{t_1}} \cdot 100\%.$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение, идентификация и характеристика микроорганизмов-деструкторов

Для изучения разнообразия микроорганизмов Балтийского моря и их биодegradативного потенциала осуществляли отбор проб седиментов и морской воды в зимний и летний периоды в

двух точках Финского залива – порт Усть-Луга и деревня Кандикюля (Ленинградская обл.). Выделение штаммов-деструкторов из отобранных образцов проводили путем сочетания двух методов: прямого посева серий разведений на агаризованную среду Эванса и пролонгированного накопительного культивирования в минеральной среде. В результате использования второго метода, как правило, доминируют микроорганизмы, обладающие наибольшей скоростью роста и конкурентоспособностью [12], поэтому комбинирование двух данных подходов позволяет выявить наибольшее количество бактериальных штаммов, активных как деструкторы нефти и ее компонентов. Всего с использованием двух методов на различных субстратах выделено из зимних образцов 78 и из летних 118 бактериальных штаммов, катаболизирующих углеводороды нефти (табл. 2).

Установлено, что около половины всех изолированных микроорганизмов способны к росту на толуоле, треть штаммов – на нафталине и четверть штаммов используют нефть, дизельное топливо, гексадекан и/или фенантрен в качестве единственного источника углерода и энергии. Из протестированных ароматических соединений Tol характеризуется наибольшей биодоступностью в водных экосистемах [13], поэтому неудивительно, что значительное количество выделенных бактериальных штаммов способны к ассимиляции данного компонента.

Штаммы, обладающие наиболее широкой субстратной специфичностью (см. табл. 1), были отобраны из 196 исследованных образцов для эксперимента в микрокосмах. Эти штаммы относятся к различным родам бактерий, присутствуют как в зимних, так и в летних образцах и проявляют разную активность в отношении алифатической и ароматической составляющих нефти. Микроорганизмы *Rhodococcus* sp. 12 и *Delftia* sp. 14 были выделены из образцов воды; *Pseudomonas* sp. 24, *Rhodococcus* sp. 28, *Sphingobacterium* sp. 33 и *Stenotrophomonas* sp. 63 – из образцов седиментов.

Таблица 2

Количественное распределение штаммов, выделенных двумя методами (зимняя проба/летняя проба)

Quantitative distribution of strains isolated by two different methods (winter sample/summer sample)

Точка сбора	Накопительное культивирование		Прямой посев	
	Вода	Седимент	Вода	Седимент
д. Кандикюля	12/13	11/16	8/11	8/30
п. Усть-Луга	10/12	11/11	9/5	9/20

Динамика убыли углеводов нефти в лабораторных модельных системах

Нефтеокисляющую активность выделенных штаммов-деструкторов и микробных сообществ воды и седиментов Финского залива изучали в лабораторной модельной системе (микрокосмах), используя летние и зимние условно «чистые» пробы, отобранные у деревни Кандикюля. В экспериментах моделировали события, максимально приближенные к реальному сценарию внезапного разлива нефти в акватории Балтийского моря.

На рис. 1 представлены данные по динамике остаточной концентрации нефти в модельных системах при длительности эксперимента 21 сут. Выявлено незначительное увеличение концентрации углеводов на 14-е сутки в системах № 3 и 4, не содержащих внесенных микроорганизмов-деструкторов, что, возможно, связано с присутствием в них микроскопических водорослей [14]. В системах 1 и 2 такого увеличения концентрации углеводов на 14-е сутки замечено не было, вероятно, потому, что внесение микроорганизмов ингибирует рост микроскопических водорослей.

Наибольшая скорость убыли нефти выявлена во всех системах в течение первых 7 сут. Сходная динамика изменения концентрации нефти наблюдалась в течение 21 сут для микрокосмов 1, 2 и 5 с внесенными микроорганизмами. Уровень концентрации нефти в этих системах был ниже по сравнению с микрокосмами 3 и 4, содержащими только аборигенные микроорганизмы-деструкторы (см. рис. 1).

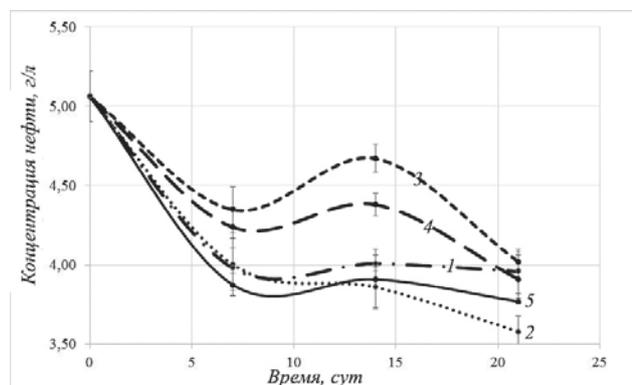


Рис. 1. Динамика остаточной концентрации нефти в микрокосмах (номера кривых соответствуют номерам моделей)

Fig. 1. Dynamics of oil residual concentration in microcosms (curve numbers are in consent with system numbers)

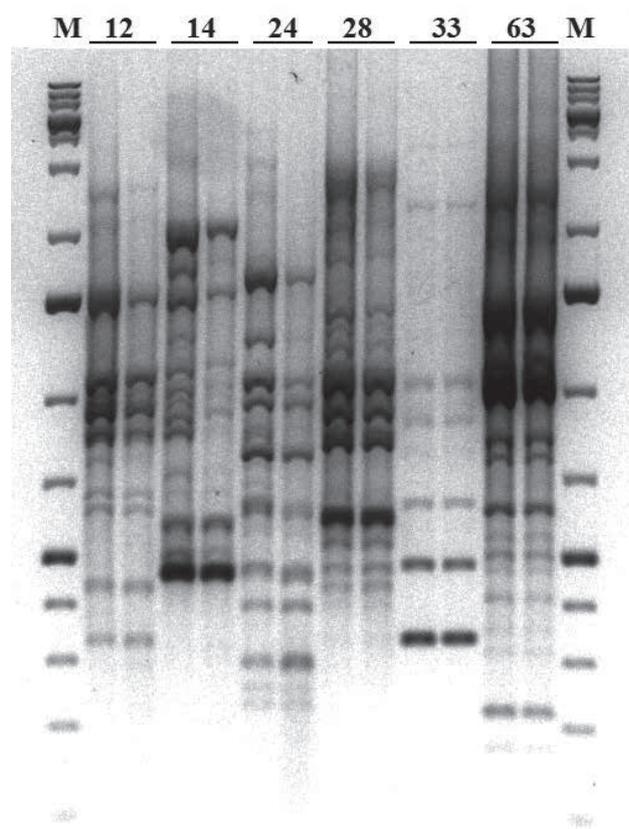


Рис. 2. Сравнение профилей геномного фингерпринта тестируемых колоний (2-я дорожка каждого образца) с контрольными профилями (1-я дорожка каждого образца). М – маркеры ММ ДНК (1kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific, США). Номера дорожек соответствуют рабочим номерам исследуемых штаммов, внесенных в микрокосмы.

Fig. 2. Comparison of colonies genome fingerprints (second lane in each sample) with control profiles (first lane in each sample). M – DNA MM markers (1kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific, USA). Lane numbers correspond to working numbers of strains introduced in microcosms

Мониторинг численности внесенных бактериальных штаммов

Сравнение морфологических признаков бактериальных колоний, а также контрольных профилей геномного фингерпринта и профилей тестируемых штаммов (рис. 2) позволило определить присутствие интродуцированных микроорганизмов в модельных системах.

Чтобы проследить за судьбой отдельных штаммов, внесенных в модель № 5, их относительное содержание подсчитывали на 7-е и 21-е сутки после посева серий разведений на агаризованные среды R2A и Эванса с нефтью. Результаты по КОЕ, полученные на обеих средах, были сравнимыми, поэтому они приведены в виде единого массива данных (табл. 3). На 7-е сутки повысилось относительное содержание

Соотношение штаммов в контрольной модели (№ 5) в различные сроки культивирования

Abundance ratio of strains in microcosm 5 at various times of culturing

Штамм	Относительное содержание, %	
	7-е сут	21-е сут
<i>Rhodococcus</i> sp. 12	24,50	6,35
<i>Delftia</i> sp. 14	6,60	2,00
<i>Pseudomonas</i> sp. 24	13,35	7,50
<i>Rhodococcus</i> sp. 28	21,10	6,65
<i>Sphingobacterium</i> sp. 33	13,35	23,00
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 63	21,10	54,50
Общая численность микроорганизмов, кл/мл	$(5,3 \pm 0,5) \cdot 10^8$	$(1,9 \pm 0,1) \cdot 10^9$
Общее содержание КОЕ/мл	$(1,44 \pm 0,08) \cdot 10^5$	$(1,65 \pm 0,04) \cdot 10^6$

Примечание: клеточные суспензии бактерий добавляли в равном соотношении в конечной концентрации $5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, т.е. исходная концентрация каждого штамма (КОЕ/мл) составляла 16,7% от концентрации всей ассоциации.

Footnote: bacterial suspensions were added in equal ratios up to the final concentration of $5 \cdot 10^6$ CFU/mL, namely, the starting concentration of each strain (CFU/mL) made up 16,7% of all association concentration.

штаммов *Rhodococcus* sp. 12, *Rhodococcus* sp. 28 и *Stenotrophomonas* sp. 63, а на 21-е сутки в микрокосме стали значительно преобладать штаммы *Sphingobacterium* sp. 33 и *Stenotrophomonas* sp. 63. Следует отметить, что относительное содержание *Delftia* sp. 14 резко уменьшилось уже на 7-е сутки эксперимента.

Доминирование штамма *Stenotrophomonas* sp. 63 к третьей неделе эксперимента (54% от числа КОЕ) можно объяснить тем, что к этому времени фракционный состав внесенной в микрокосм нефти меняется в сторону преобладания тяжелых фракций, а штамм *Stenotrophomonas* sp. 63 как раз проявляет высокую активность в отношении указанных фракций. Это предположение согласуется с данными о том, что представители *Stenotrophomonas* обладают широкой субстратной специфичностью к высокомолекулярным полициклическим ароматическим углеводородам (количество бензольных колец в молекуле от 3 до 7) [15].

Численность подсчитанных колоний для модельной системы № 5 на чашках с полноценной средой была в 2–3 раза выше, чем на среде с нефтью. Однако общее количество бактериальных клеток, подсчитанных в камере Горяева, оказалось больше среднего числа КОЕ на 3 порядка. Разница в числе КОЕ и общей численности бактериальных клеток может объясняться тем, что только крайне малая часть внесенных в микрокосм № 5 микроорганизмов, приспособившихся к существованию в морской воде Бал-

тийского моря, может выживать на минеральных и полноценных средах, несмотря на то, что изначально они были выращены на среде Эванса с нефтью. В отличие от использованных микробиологических сред, вода Балтийского моря характеризуется крайне низким содержанием фосфора и азота, поэтому штаммы-деструкторы при переносе с воды на среды испытывают стресс, влияющий на их способность к росту. Это согласуется с тем, что изначально считавшиеся некультивируемыми бактериальные штаммы, присутствующие в морской воде и осадках, все же через длительное время начинают расти на сильно обедненных средах [16]. Исходя из полученных нами результатов, следует указать, что прямой подсчет на чашках относительного содержания штаммов (КОЕ), по-видимому, не отражает действительного соотношения этих микроорганизмов в микрокосмах.

В моделях № 1, 2, 3 и 4 реальное количество бактериальных клеток также превышало на 10^2 значение КОЕ/мл, при этом значение КОЕ/мл и общая численность микроорганизмов в микрокосме № 5 были выше аналогичных показателей других систем в среднем на порядок (данные не приведены). Данный факт можно объяснить отсутствием конкуренции со стороны аборигенной микрофлоры в отношении штаммов, внесенных в микрокосм № 5.

Несмотря на то, что в моделях № 1 и 2 выявлялись представители внесенных штаммов, достоверно подсчитать их относительное содержание

Коэффициент относительной нефтеокисляющей активности и изменение числа КОЕ штаммов-нефтедеструкторов за определенный период времени

Coefficient of relative oil-oxidizing microbial activity and relative change of CFU percentage of degrading strains for definite time period

№ модели	Изменение числа КОЕ, %			Коэффициент, ч ⁻¹		
	7–14-е сутки	15–21-е сутки	7–21-е сутки	7–14-е сутки	15–21-е сутки	7–21-е сутки
1	86,18	40,29	91,75	0,007	0,015	0,003
2	88,21	37,78	92,67	0,007	0,015	0,003
3	38,10	96,07	41,85	0,017	0,084	0,007
4	88,15	73,20	96,84	0,007	0,007	0,003
5	95,62	-98,82	91,29	0,006	-0,006	0,003

невозможно, так как данные микроорганизмы в этих микрокосмах присутствовали уже изначально.

Анализ относительной нефтеокисляющей активности в микрокосмах

Для численной оценки метаболической активности нельзя было использовать метаболический коэффициент, поскольку не представлялось возможным оценить изменение биомассы в микрокосмах. Поэтому мы ввели понятие «коэффициент относительной нефтеокисляющей активности», где метаболическая активность выражается через отношение изменения концентрации нефти к изменению числа КОЕ за определенный период времени (см. раздел «Условия эксперимента»).

Наибольшие значения изменения числа КОЕ во всех микрокосмах выявлены в период с 7-х по 14-е сутки; в последующие семь дней данные показатели снизились более чем в 2 раза (табл. 4). Подсчитанные значения коэффициента относительной нефтеокисляющей активности микроорганизмов для моделей № 1, 2, 4 и 5 в разные периоды были весьма близки. Наименьшее относительное изменение числа КОЕ зафиксировано в микрокосме № 3 (см. табл. 4). Несмотря на то, что убыль углеводов нефти в этом микрокосме была меньше, чем в модельных системах № 2, 4 и 5, коэффициент относительной нефтеокисляющей активности для него был выше остальных на всех стадиях эксперимента, а максимальное значение он приобрел в период с 14-х по 21-е сутки. Полученные данные свидетельствуют о том, что обе летние пробы характеризуются максимальной убылью нефти (см. рис. 1). Следует отметить, что зимняя проба без внесенных в нее микроорганизмов-деструкторов достигает наибольшей от-

носительной нефтеокисляющей активности микроорганизмов к 21-м суткам эксперимента за счет наибольшего относительного потребления углеводов нефти на микробную единицу. Таким образом, при оценке процесса биодegradации нефти в морских экосистемах следует учитывать как изменение концентрации углеводов, так и относительную метаболическую активность микробных штаммов.

Эксперименты с микрокосмами, содержащими образцы морской воды и седиментов Балтийского моря, показали, что внесение штаммов-нефтедеструкторов увеличивает убыль нефти по сравнению с микрокосмами без внесенных микроорганизмов. Наименьшее количество бактериальных клеток наблюдалось в зимней пробе, а наибольшее – в контрольной системе, содержащей только шесть штаммов-нефтедеструкторов, что объясняется отсутствием конкуренции со стороны аборигенной микрофлоры. Значения коэффициентов относительной нефтеокисляющей активности были практически одинаковыми как у микрокосмов с внесенными микроорганизмами-деструкторами, так и у микрокосмов без них. Исключением является наибольший коэффициент относительной нефтеокисляющей активности, наблюдаемый у микрокосмов с зимней пробой без внесенных штаммов к третьей неделе эксперимента. Как зимние, так и летние пробы морской воды и седиментов обладают достаточным потенциалом для биодegradации нефти, однако внесение нефтеокисляющих бактериальных штаммов интенсифицирует этот процесс.

Данная работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, уникальный идентификатор проекта – RFMEFI61615X0038.

ЛИТЕРАТУРА

- Riemann L., Leitet C., Pommier T., et al. The native bacterioplankton community in the central Baltic sea is influenced by freshwater bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, 74 (2), 503–515. doi: 10.1128/AEM.01983-07
- Viggor S., Juhanson J., Jõesaar M., et al. Dynamic changes in the structure of microbial communities in the Baltic sea coastal seawater microcosms modified by crude oil, shale oil or diesel fuel. *Microbiol. Res.*, 2013, 168 (7), 415–427. doi: 10.1016/j.micres.2013.02.006
- Suni S., Koskinen K., Kauppi S., et al. Removal by sorption and *in situ* biodegradation of oil spills limits damage to marine biota: a laboratory simulation. *Ambio*, 2007, 36 (2-3), 173–179. doi: 10.1579/0044-7447(2007)36[173:RBSAIS]2.0.CO;2
- Гафаров А.Б., Панов А.В., Филонов А.Е., Боронин А.М. Изменение состава сообщества бактерий – деструкторов ароматических соединений в нефтешламах в процессе их обезвреживания в проточном био-реакторе. *Прикладная биохим. микробиол.*, 2006, 42(2), 180–186. doi: 10.1134/S0003683806020086
- Evans C.G.T., Herbert D., Tempest D.W. The continuous cultivation of microorganisms. 2. Construction of a chemostat. In: *Methods in Microbiology*. V. 2. [Eds. J.R. Norris, D.W. Ribbons]. London: Acad. Press, 1970, 277–327.
- Бакиров Э. А., Ермолкин В.И., Ларин В.И., Мальцев А.К., Рожков Э.Л. Геология нефти и газа. [Под ред. Э.А. Бакирова]. М: Недра, 1990, 240с.
- De Bruyne K., Slabbinck B., Waegeman W., et al. Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. *Systematic Appl. Microbiol.*, 2011, 34(1), 20–29. doi: 10.1016/j.syapm.2010.11.003
- Dombek P.E., Johnson L.K., Zimmerley S.T., Sadowsky M.J. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66 (6), 2572–2577. doi: 10.1128/AEM.66.6.2572-2577.2000
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989, 1626.
- Кучуров Л.С., Максакова Е.И. Определение концентрации нефти в почве методом инфракрасной спектрофотометрии: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006, 16с.
- Нетте И.Т., Новикова Г.А. Рост дрожжей и образование ими этанола: Практикум по микробиологии. [Под ред. Н.С. Егорова]. М: Изд-во Моск. ун-та. 1976, 192–194.
- Smith Z. A., McCaig E., Stephen J.R., et al. Species diversity of uncultured and cultured populations of soil and marine ammonia oxidizing bacteria. *Microbial ecology*, 2001, 42 (3), 228–237. doi: 10.1007/s00248-001-0016-x
- Griffin R., Churchill P., Churchill S., and Jones L. Biodegradation rate enhancement of hydrocarbons by an oleophilic fertilizer and a rhamnolipid biosurfactant. *J. Environm. Quality*, 1995, 24 (1), 19–28. doi: 10.2134/jeq1995.00472425002400010003x
- Qin J. G. Hydrocarbons from Algae. In: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* [Ed. Prof. K.N. Timmis]. Berlin: Springer Berlin Heidelberg. 2010, 2817–2826.
- Juhasz A.L., Stanley G.A., Britz M.L. Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2000, 30(5), 396–401. doi: 10.1046/j.1472-765x.2000.00733.x
- Giovannoni S.J., Foster R.A., Rappe M.S., Epstein S. New cultivation strategies bring more microbial plankton species into the laboratory. *Oceanography*, 2007, 20 (2), 62–69. doi: 10.5670/oceanog.2007.49

Assessment of Degradative Potential of Oil-Oxidizing Microorganisms of the Baltic Sea in Model Microcosms

S.L. SOKOLOV*, O.I. SAZONOVA, A.B. GAFAROV, A.A. IVANOVA, A.A. VETROVA, N.V. PRISIAZHAYA, I.A. KOSHELEVA, and A.M. BORONIN

Skryabin Institute for Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 142290, Pushchino, Moskovskaya Oblast, Russia

*e-mail: sls@ibpm.pushchino.ru**

Received November 10, 2016

Accepted December 26, 2016

Abstract—The degradative potential of the Baltic Sea bacterioplankton in model systems with water and sediment of the Gulf of Finland has been investigated. Microorganisms that are capable of degrading crude oil, diesel fuel, phenanthrene, naphthalene and BTEX were isolated and identified. Introducing of six selected degrading microorganisms in the model systems increased the potential of the indigenous microbial community to degrade oil hydrocarbons. The oil decrease occurred in the summer samples with or without microorganism introduction, but to a greater extent in the first case. The coefficients of relative oil-oxidizing activity for all model systems were defined. The winter sample without microbial augmentation was shown to have the greatest relative activity of aboriginal oil-oxidizing microorganisms.

Key words: biodegradation, laboratory model systems, degrading microorganisms, oil hydrocarbons.

Acknowledgements—The work was supported by the Ministry of Education and Science of RF (Project Unique Identifier RFMEFI61615X0038).

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-4-76-84