

Резюме проекта, выполняемого

в рамках ФЦП

«Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы»

по этапу № 3

Номер Соглашения о предоставлении субсидии: 14.616.21.0038

Тема: «Влияние аварийных разливов нефти на микробное разнообразие в поверхностных водах и осадках Балтийского моря в летний и зимний периоды»

Приоритетное направление: Науки о жизни (НЖ)

Критическая технология: Технологии мониторинга и прогнозирования состояния окружающей среды, предотвращения и ликвидации ее загрязнения

Период выполнения: 24.08.2015 - 31.12.2017

Плановое финансирование проекта: 27.75 млн. руб.

Бюджетные средства 6.30 млн. руб.,

Внебюджетные средства 21.45 млн. руб.

Получатель: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им.Г.К.Скрябина Российской академии наук

Иностранный партнер: Tartu Ülikool

Иностранный партнер: Университет Хельсинки

Ключевые слова: Науки об окружающей среде, морская микробиология, молекулярная биология

1. Цель проекта

Задачей данного проекта является детальное изучение биодegradативного потенциала микробных сообществ в поверхностных водах и осадках Балтийского моря в летний и зимний периоды для развития современных стратегий биоремедиации и биоаугментации.

Целью третьего этапа являлось проведение экспериментальных исследований для получения достаточных и достоверных экспериментальных результатов для решения поставленных научно-исследовательских задач.

2. Основные результаты проекта

1) Выполнен аналитический обзор современной литературы, проведены патентные исследования, отобраны образцы для дальнейшего анализа. Сотрудники проекта участвовали в различных конференциях.

2) В аналитическом обзоре современной научно-технической, нормативной, методической литературы, затрагивающей научно-техническую проблему, исследуемую в рамках выполнения проекта были рассмотрены проблемы нефтезагрязнения Балтийского моря, методы очистки водных экосистем от загрязнений нефтью и нефтепродуктами, биодegradация углеводородов нефти, основные подходы к биоремедиации нефтезагрязненных акваторий, а также биопрепараты, применяемые для очистки нефтезагрязненных экосистем.

В результате выполнения патентного исследования проведена систематизация существующих способов и технологий биоремедиации водных бассейнов, нахождение и анализ релевантных ссылок на научно-технические публикации, тексты заявок и патентов на изобретения по теме, которая изложена в техническом задании на патентное исследование «Проведение патентных исследований в области разработок эффективной технологии биоремедиации водного бассейна Балтийского моря в летний и зимний периоды». В процессе поиска исследовались разные варианты патентной защиты технических решений, направленных на создание эффективных биопрепаратов для деструкции нефти и нефтепродуктов при биоремедиации водных бассейнов, рассматривалось исследование состояния рынка микробиологических препаратов для биоремедиации нефтезагрязненных акваторий России.

Для определения микробной активности и микробного разнообразия в воде и осадках Балтийского моря отобраны образцы в зимний период из мест с различным уровнем загрязнения и с наиболее различающимися физико-химическими параметрами (соленость, pH, температура, насыщенность кислородом, толщина льда и т.д.). Все образцы отобраны одновременно по единой методике и переданы группам исследователей из России и Финляндии для дальнейшего анализа.

Сотрудники проекта совместно с представителями Института молекулярной и клеточной биологии Университета Тарту (Эстония) участвовали в мероприятиях, направленных на освещение и популяризацию промежуточных и окончательных результатов научных исследований.

3) При выполнении работ на 1 этапе проекта был проведен отбор и характеристика физико-химических параметров образцов воды и седиментов Балтийского моря.

4) В соответствии с приложением 1 к Соглашению в рамках выполнения 1 этапа были получены следующие научно-технические результаты, а именно, составлен отчет о научных исследованиях, содержащий не менее 15 научно-информационных источников за период 2010 – 2015 гг; проведены патентные исследования в соответствии с ГОСТ Р 15.011-96; проведен отбор проб морской воды и седиментов Балтийского совместно с иностранными партнерами. Таким образом, полученные результаты соответствуют требованиям к выполняемому проекту.

5) В результате выполнения 2 этапа работы было выделено 78 штаммов микроорганизмов деструкторов углеводородов нефти. Был разработан документ «Проект методических рекомендаций по выделению и характеристике эффективных углеводородокисляющих микроорганизмов». Выделенные микроорганизмы были охарактеризованы по следующим признакам: наличие плазмид Р-9 и Р-7 групп несовместимости, наличие гена катехол-2,3-диоксигеназы – ключевого фермента пути деградации полициклических ароматических углеводородов. На основании полученных данных был составлен «Акт о проведении исследования плазмидного профиля». Также была составлена кластерная дендрограмма, демонстрирующая высокое биоразнообразие у выделенных микробных штаммов. В коллекцию микроорганизмов с использованием традиционных микробиологических методов выделения штаммов, как из накопительных культур, так и прямым высевом на селективные среды могут войти бактерии 7, 11, 17, 19, 24, 30, 35, 37, 40 и 60 с меньшей вероятностью штаммы 9, 20, 21, 33, 43, 53, 55, 57, 69 и 71. В разделе 2 отчета описаны маркерные последовательности ДНК, позволяющие определить присутствие в окружающей среде исследуемых микроорганизмов без необходимости проведения генных модификаций. Составлена характеристика обнаруженных катаболических генов с использованием метода ПЦР со специфическими олигонуклеотидными праймерами.

6) В рамках выполнения работы сотрудниками Департамента наук об окружающей среде Университета Хельсинки (Финляндия) были разработаны методики выделения ДНК из морской воды и седиментов.

Также были проведены работы по выделению из проб воды и седиментов природных штаммов-деструкторов нефти представителями Института молекулярной и клеточной биологии Университета Тарту (Эстония). Определение общего микробного числа для воды и седиментов Балтийского моря дало средние значения $1,3 \times 10^4$ КОЕ/мл и 5×10^5 КОЕ/г для образцов воды и седиментов, соответственно. При проверке более, чем 200 изолятов было выделено 6 классов микроорганизмов, присутствующих в воде Финского залива: три класса *Proteobacteria* (*Alpha-*, *Beta-* и *Gamma**proteobacteria*), *Chloroflexy*, *Actinobacteria* и *Cyanobacteria*. Из образцов, выделенных из морской воды, были выделены и идентифицированы 114 углеводородокисляющих изолятов. Из образцов седиментов выделены и охарактеризованы 93 углеводородокисляющих изолята.

7) В соответствии с приложением 1 к Соглашению в рамках выполнения 2 этапа были получены следующие научно-технические результаты, а именно, выделены 78 микроорганизмов-деструкторов с использованием традиционных микробиологических методов выделения штаммов, как из накопительных культур, так и прямым высевом на селективные среды; составлен «Проект методических рекомендаций по выделению и характеристике эффективных углеводородокисляющих микроорганизмов»; иностранными партнерами подготовлены препараты тотальной ДНК/РНК из проб воды и седиментов для метагеномного секвенирования. Таким образом, полученные результаты соответствуют требованиям к выполняемому проекту.

8) Проведенный химический анализ отобранных образцов на 3 этапе позволил выявить перечень характеристик, необходимых для селекции наиболее перспективных бактерий-деструкторов углеводородов из выделенных микроорганизмов. В результате выполнения поставленных задач было выделено 95 штаммов микроорганизмов деструкторов углеводородов нефти. Выделенные микроорганизмы были охарактеризованы по следующим признакам: наличие плазмид Р-9 и Р-7 групп несовместимости, наличие генов катехол-2,3-диоксигеназы, алкан-гидроксилазы, салицилат-5-гидроксилазы, салицилат-1-монооксигеназы, фенантрен-3,4-монооксигеназы, нафталин-1,2-диоксигеназы – ключевых ферментов путей деградации углеводородов. Также была составлена кластерная дендрограмма, демонстрирующая высокое биоразнообразие у выделенных микробных штаммов. В коллекцию микроорганизмов с использованием традиционных микробиологических методов выделения штаммов, как из накопительных культур, так и прямым высевом на селективные среды могут войти бактерии 2, 3, 5, 8, 9, 15, 17, 29, 32, 34, 38, 39, 40, 42, 48, 74, 80, 82, 84, 89.

9) В разделе 3 отчета по 3 этапу описаны маркерные последовательности ДНК, позволяющие определить присутствие в окружающей среде исследуемых микроорганизмов без необходимости проведения генных модификаций. Составлена характеристика обнаруженных катаболических генов с использованием метода ПЦР со специфическими олигонуклеотидными праймерами.

10) На 3 этапе были проведены работы по подготовке препаратов тотальной ДНК/РНК из проб воды и седиментов для метагеномного секвенирования сотрудниками Департамента наук об окружающей среде Университета Хельсинки, Финляндия. Составлена база данных метагеномных последовательностей бактериопланктона Балтийского моря, представлена в самостоятельном документе.

11) Были проведены работы по отбору и характеристике образцов проб воды и седиментов Балтийского моря в летний период сотрудниками Института молекулярной и клеточной биологии Университета Тарту (Эстония). Представителями Института молекулярной и клеточной биологии Университета Тарту (Эстония) были выделены природные штаммы деструкторы из образцов воды и седиментов. Определение общего микробного числа для воды и седиментов Балтийского моря дало средние значения $1,3 \times 10^4$ КОЕ/мл и 5×10^5 КОЕ/г для образцов воды и седиментов, соответственно. При проверке более, чем 200 изолятов было выделено 6 классов микроорганизмов, присутствующих в воде Финского залива: три класса *Proteobacteria* (*Alpha-*, *Beta-* и *Gamma**proteobacteria*), *Chloroflexy*, *Actinobacteria* и *Cyanobacteria*. Из образцов, выделенных из морской воды, были выделены и идентифицированы углеводородокисляющих 114 изолятов. Из образцов седиментов выделены и охарактеризованы 93 углеводородокисляющих изолята.

12) Сотрудники проекта участвовали в мероприятиях, направленных на освещение и популяризацию промежуточных и окончательных результатов научных исследований.

14) Рекомендации по внедрению результатов проекта – разработка биопрепаратов на основе микроорганизмов-деструкторов и технологий их использования для очистки нефтезагрязненных вод Балтийского моря.

15) На сегодняшний день вопросы изучения механизмов адаптации бактерий в новых условиях среды и разнообразия

микроорганизмов являются актуальными.

3. Охраноспособные результаты интеллектуальной деятельности (РИД), полученные в рамках прикладного научного исследования и экспериментальной разработки

Отсутствуют.

4. Назначение и область применения результатов проекта

1) Результаты, полученные в рамках проводимого проекта, имеют фундаментальное значение для понимания механизмов расширения метаболического потенциала микроорганизмов и адаптации бактерий к новым условиям окружающей среды, что позволит использовать полученные данные для повышения качества учебно-образовательного процесса в курсах лекций, учебно-методических пособиях и при проведении практических занятий в Пушкинском Государственном естественнонаучном институте, на кафедрах биотехнологии, биологии и химии Естественнонаучного факультета Тульского Государственного университета. Кроме того, полученные результаты могут быть использованы при проведении курсов повышения квалификации профессорско-преподавательского состава ВУЗов РФ, организованных при ПушГЕНИ по специальности «Современные аспекты микробиологии и биотехнологии», а также в рабочей программе «Биотехнологии защиты и очистки окружающей среды от загрязнения нефтью и нефтепродуктами» Института непрерывного образования и повышения квалификации Кызылординского государственного университета им. Коркыт Ата, Республика Казахстан.

2) Результаты проекта, оформленные в виде патентов, рекомендаций и методик могут быть использованы при проведении опытно-промышленных испытаний биотехнологий переработки нефтесодержащих отходов различными отечественными и зарубежными компаниям для их последующей коммерциализации и широкомасштабного применения (ОАО "Газпром нефть", ОАО «НК «Роснефть», ОАО «Транснефть», ОАО «Лукойл», ОАО «Сургутнефтегаз», ОАО «Ноябрьскнефтегаз», ОАО «Краснодарнефтегаз», ЗАО «Биоойл» и др.).

В настоящее время основными рынками потребления услуг по очистки нефтезагрязненных акваторий являются:

- нефтедобывающие компании;
- предприятия, занятые транспортировкой нефтепродуктов и обслуживающие магистральные нефтепроводы;
- нефтеперерабатывающие компании;
- службы, отвечающие за состояние водоохраных зон;
- компании, занимающиеся судоходством;
- агентство по защите окружающей среды Европейских стран.

3) Полученные результаты позволят расширить знания о механизмах адаптации бактерий к новым условиям окружающей среды, что поспособствует дальнейшему развитию исследований в данном направлении в рамках международного сотрудничества.

5. Эффекты от внедрения результатов проекта

Уменьшение отрицательного техногенного воздействия на окружающую среду. Результаты, полученные в рамках выполнения проекта могут быть использованы для проведения опытно-технологических разработок, направленных на создание технологии очистки нефтезагрязненных участков акватории Балтийского моря с использованием углеводородокисляющих микроорганизмов, сочетающих механические, физико-химические и биологические методы. Полученные в ходе выполнения данного проекта результаты могут быть использованы при подготовке проекта технического задания на проведение ОТР по созданию технологии очистки нефтезагрязненных участков акватории Балтийского моря с использованием углеводородокисляющих микроорганизмов в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России до 2020 года».

6. Формы и объемы коммерциализации результатов проекта

Не предусмотрены соглашением о предоставлении субсидии.

7. Наличие соисполнителей

Отсутствуют.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им.Г.К.Скрябина Российской академии наук

Директор
(должность)

(подпись)

Боронин А.М.
(фамилия, имя, отчество)

Руководитель работ по проекту

Директор
(должность)

(подпись)

Боронин А.М.
(фамилия, имя, отчество)

М.П.