

Резюме проекта, выполненного

в рамках ФЦП

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

по этапу № 5/итоговый

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 - 30.06.2018

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: Тартуский университет

Иностранный партнер: Хельсинкский университет

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

1. Цель проекта

Целью 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.

2. Основные результаты проекта

Выполнен аналитический обзор современной литературы, проведены патентные исследования, отобраны образцы для дальнейшего анализа. Сотрудники проекта участвовали в различных конференциях. В аналитическом обзоре современной научно-технической, нормативной, методической литературы, затрагивающей научно-техническую проблему, исследуемую в рамках НИР, 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. Был проведен отбор и характеристика физико-химических параметров образцов воды и осадков Балтийского моря. Было выделено 78 штаммов микроорганизмов деструкторов углеводородов нефти из образцов отобранных в зимний период. 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.

Проведенный химический анализ отобранных образцов 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 из образцов, отобранных в летний период. 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. 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.

Проведено изучение химической структуры биосурфактантов (биоПАВ) у штаммов-деструкторов углеводородов нефти. Подготовлен документ «Перечень химических структур биосурфактантов». Также разработан документ «Перечень маркерных последовательностей ДНК, позволяющих определить присутствие в окружающей среде исследуемых микроорганизмов». Проведены испытания биоразлагаемых носителей и сорбентов в модельных экспериментах. Сотрудники проекта подготовили «Лабораторный регламент получения биоразлагаемых биосорбентов для использования в биоремедиации и биоаугментации поверхностных вод и седиментов Балтийского моря», «Акт получения экспериментального образца носителя для микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти». Разработан и получен экспериментальный образец ассоциации микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти как основы биопрепарата для биоремедиации и биоаугментации поверхностных вод и седиментов Балтийского моря. Составлены паспорта микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти. Проведена оптимизация условий культивирования микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти для наибольшего выхода активной биомассы. На основе данных работ разработан «Лабораторный регламент на получение и хранение микроорганизмов- деструкторов углеводородов нефти и их ассоциации для использования в биоремедиации и биоаугментации поверхностных вод и седиментов Балтийского моря».

Сотрудники ИБФМ РАН принимали участие в мероприятиях, направленных на освещение и популяризацию промежуточных и окончательных результатов научных исследований. Подготовлена заявка на изобретение на патент РФ «Консорциум микроорганизмов для очистки поверхностных вод и седиментов Балтийского моря от нефти и нефтепродуктов в летний и зимний периоды». Сотрудники ИБФМ РАН подготовили 3 публикации в научных журналах, индексируемых в базах данных WEB OF SCIENCE и SCOPUS, а именно, «Биотехнология» и «Микробиология», «Frontiers in Microbiology»

Взаимосвязью с работами иностранного партнера является исследование образцов отобранных в летний и зимний период проб, обобщение полученных результатов всех участников проекта для определения влияния аварийных разливов нефти на микробное разнообразие в поверхностных водах и седиментах Балтийского моря в летний и зимний периоды.

В рамках выполнения работы сотрудниками Департамента наук об окружающей среде Университета Хельсинки (Финляндия) были разработаны методики выделения ДНК из морской воды и седиментов. 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), *Chloroflexi*, *Actinobacteria* и *Cyanobacteria*. Из образцов, выделенных из морской воды, были выделены и идентифицированы 114 углеводородоокисляющих изолятов. Из образцов седиментов выделены и охарактеризованы 93 углеводородоокисляющих изолята.

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. Проведено изучение экспрессии катаболических генов у выделенных штаммов методами ПЦР в реальном времени. Также сотрудниками Института молекулярной и клеточной биологии Университета Тарту (Эстония) подготовлена публикация в научном журнале, индексируемом в базах данных Web of science и Scopus. Были получены препараты геномной ДНК активных штаммов-деструкторов углеводородов нефти. Также было проведено секвенирование геномов активных штаммов-деструкторов углеводородов нефти. Подготовлены паспорта микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти.

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

Подана заявка на изобретение (патент РФ) 2017136245 от 13.10.2017 г "Консорциум микроорганизмов для очистки поверхностных вод и седиментов Балтийского моря от нефти и нефтепродуктов.

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 Пушчинском 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 компаниями 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 очистке 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 углекислородокисляющих 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 углекислородокисляющих 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 соглашениями.

7. Наличие соисполнителей

Отсутствуют

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

Временно исполняющий обязанности директора
(должность)

(подпись)

Леонтьевский А.А.
(фамилия, имя, отчество)

Руководитель работ по проекту

директор
(должность)

(подпись)

Боронин А.М.
(фамилия, имя, отчество)

М.П.