

Аннотация проекта (ПНИЭР), выполняемого в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы»

Номер соглашения о предоставлении субсидии (государственного контракта)
14.616.21.0038

Название проекта

Влияние аварийных разливов нефти на микробное разнообразие в поверхностных водах и седиментах Балтийского моря в летний и зимний периоды

Тематическое направление

Науки о жизни

Исполнитель

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

Цели и задачи исследования

Целью данной работы являлось изучение биodeградативного потенциала микробных сообществ в поверхностных водах и седиментах Балтийского моря в летний и зимний периоды для развития современных стратегий биоремедиации и биоаугментации.

Задачами данного этапа проекта являлись выделение и характеристика микроорганизмов-деструкторов нефти и нефтепродуктов из образцов воды и седиментов Балтийского моря, а также исследование плазмидного профиля и наличия катаболических генов у выделенных штаммов.

Актуальность и новизна исследования

Балтийское море считается одним из морей, экологическое состояние которых вызывает тревогу. Углеводороды нефти поступают в Балтийское море из многих источников, в частности с речным и поверхностным стоком, в результате прямых сбросов из городов, предприятий. Другими важными источниками являются очистка нефтяных танкеров и умышленные сбросы с судов, а также разливы нефти при авариях (посадка танкеров на мель, случайные выбросы из нефтехранилищ), утечки при разведочных работах и эксплуатации прибрежных платформ. Ликвидация нефтяного разлива на море ставит перед собой цель уменьшить ущерб для экологических и социально-экономических ресурсов. Микробная ремедиация загрязненных углеводородами территорий является доступным и экологически безопасным методом очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений.

Данный проект нацелен на передовые исследования в области биотехнологии окружающей среды в регионах с холодным климатом. В ходе выполнения проекта ожидается получение ключевых знаний о Балтийских экосистемах и их реакции на загрязнение окружающей среды в условиях холодного климата. Современное состояние проблемы загрязнения Балтийского моря касается не одной страны, а нескольких, при этом отдельный коллектив исследователей не в состоянии самостоятельно решить проблему вследствие ограниченной специфики своей деятельности и имеющихся ресурсов. Вот почему международное сотрудничество дает шанс создать новый подход к вопросу

биоремедиации Балтийского моря.

Описание исследования

Для выделения микроорганизмов из проб седиментов 10 г песка помещалось в 100 мл среды Эванса. Состав среды Эванса следующий (г/л или мл/л): K_2HPO_4 - 8.71 г, 5 М раствор NH_4Cl - 1 мл, 0.1 М раствор Na_2SO_4 - 1 мл, 62 мМ раствор $MgCl_2$ - 1 мл, 1 мМ раствор $CaCl_2$ - 1мл, 0.005 мМ раствор $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$, микроэлементы - 1мл (состав микроэлементов в г/л): ZnO - 0.41 г, $FeCl_3 \times 6 H_2O$ - 5.4 г, $MnCl_2 \times 4H_2O$ - 2 г, $CuCl_2 \times 2H_2O$ - 0.17 г, $CoCl_2 \times 6H_2O$ - 0.48 г, H_3BO_3 - 0.06 г, (рН 7.0).

Для выделения микроорганизмов из проб воды в колбу Эрленмейера помещалось 100 мл воды из Финского залива (рН=6) с добавлением в качестве источника азота 10 мМ хлорида аммония и в качестве источника фосфора 5 мМ калий-натриевого фосфатного буфера, а также добавлялись микроэлементы.

Культивирование накопительных культур проводили в 750 мл колбах Эрленмейера на качалке 160 об/мин при температуре 25°C в течении 7 суток. Субстраты вносили в следующих концентрациях – 3 г/л нефть, 5 г/л дизельное топливо, БТЭК – 5 г/л, 1 г/л нафталин и 1 г/л фенантрен. Через три дня культивирования для компенсации потери субстратов за счет эвапорации проводили повторное внесение дизельного топлива, нафталина, фенантрена и БТЭК. Все накопительные культуры пересевали один раз в неделю в соотношении 1 мл к 50 мл минеральной среды. Повторяли пересевы 3 раза. После 3-х пассажей из всех накопительных культур проводился высев на агаризованные минеральные среды Эванса с соответствующими субстратами. Через неделю культивирования на агаризованной среде проводили ещё один пересев. Так как отдельные колонии были плохо различимы между собой на минимальной агаризованной среде, собирали биомассу с середины штриха и высевали богатую агаризованную среду R2A. Культивировали в термостате при температуре 25°C в течении 7 суток.

В качестве минимальной агаризованной среды использовали среду Эванса. Субстраты добавлялись на крышку чашки Петри – дизельное топливо, БТЭК, нафталин, фенантрен. Нефть добавляли в среду в концентрации 3 г/л и распределяли ультразвуковой обработкой, два раза по 1 минуте. Прямой высев производили на чашку Петри с агаризованной средой Эванса из 1 и 2 разведений по 100 мкл суспензии из проб седиментов и без разведений из проб воды. Культивирование проводили в течение 1 месяца в термостате при температуре 25°C.

Для проведения ПЦР тотальную ДНК бактерий выделяли, используя “AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit” (“Axygen Biosciences” США). Для проверки того, насколько филогенетически близки друг другу выделенные из проб морской воды и седиментов Балтийского моря микроорганизмы и к каким популяционным группам они относятся, проводился геномный фингерпринт с использованием праймера $BOXA1R$. Косвенным свидетельством плазмидной локализации оперонов биodeградации является наличие в бактериальном штамме гена катехол-2,3-диоксигеназы (*nahH*). Препараты геномной ДНК

выделенных штаммов проверяли на наличие последовательности гена *nahH*. Препараты плазмидной ДНК получали методом щелочного лизиса, принадлежность плазмид к группам несовместимости P-7 и P-9 проверяли при помощи ПЦР с соответствующими праймерами.

Результаты исследования

В ходе работы всего было изолировано 78 штаммов-деструкторов нефти, нефтепродуктов и ароматических углеводородов. Из них методом накопительного культивирования – 44 штамма, методом прямого посева – 34 штамма.

Идентификацию микроорганизмов-деструкторов проводили, используя систему MALDI Biotyper. Установлено, что в микробных сообществах как воды, так и седиментов Финского залива основными представителями являются *Gamma*proteobacteria (*Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*). Однако в отличие от воды, в седиментах Финского залива присутствуют *Alphaproteobacteria* (*Brevundimonas* sp., *Ochrobactrum* sp.).

Электрофореграмма геномного фингерпринта была нормализована, профили штаммов преобразованы в бинарную матрицу. С использованием алгоритма neighbor joining и программы PyElph 1.4 была получена кластерная дендрограмма, которая показала высокое биоразнообразие у выделенных микробных штаммов; ни по одному форм-фактору (место выделения, способ выделения, вода/седимент, ростовой субстрат) не выявлено достоверной кластеризации. Штаммы *Stenotrophomonas* spp. 61, 62, 63, 64 и 68 родственно близки друг к другу и организуются в субклад. Однако три штамма, 61, 62 и 63, были выделены на нефти, штамм 64 – на дизельном топливе, а штамм 68 – на фенантрене, что свидетельствует о широком метаболическом потенциале у этого рода микроорганизмов.

Гены катаболизма различных ароматических углеводородов могут локализоваться в составе плазмид. Плазмиды биodeградации моно- и полиароматических углеводородов, входящих в состав нефти и нефтепродуктов, чаще всего относятся к группам несовместимости IncP-9, IncP-7 и IncP-2. Плазмиды IncP-2 в силу особенностей строения своего репликона не могут быть детектированы методом ПЦР, поэтому выделенные штаммы проверялись на наличие плазмид IncP-9 и IncP-7. Показано, что в трех штаммах присутствуют плазмиды IncP-9, в двух штаммах – плазмиды IncP-7.

Катехол-2,3-диоксигеназа является одним из ключевых ферментов деградации полициклических и моноциклических углеводородов. Считается, что наличие гена катехол-2,3-диоксигеназы (*nahH*) является косвенным свидетельством плазмидной локализации оперонов биodeградации, таким образом, проверка штаммов на наличие гена катехол-2,3-диоксигеназы служит дополнительным тестом на содержание в исследуемых штаммах плазмидной ДНК. По результатам ПЦР показано наличие гена катехол 2,3-диоксигеназы у восьми штаммов и возможное его наличие у двух штаммов. В пяти случаях наличие гена *nahH* коррелирует с наличием *repA* гена плазмид IncP-7 или IncP-9. В остальных

случаях не исключено наличие в штаммах плазмид иных групп несовместимости, либо локализации гена *nahH* на бактериальной хромосоме.

Методом щелочного лизиса удалось получить препараты плазмидных ДНК из семи бактериальных штаммов, причем в двух случаях плазмиды не принадлежат ни к группе IncP-7, ни к IncP-9. *EcoRI*-рестрикционные профили двух (7 и 30) из трех обнаруженных IncP-9 плазмид сходны между собой. Установлено, что размер обнаруженных IncP-9 плазмид составляет около 60 т.п.н., что меньше размера широко распространенных среди почвенных псевдомонад IncP-9 плазмид, таких как NAN7 и pDTG1. В штамме *Ochrobactrum* sp. 11 присутствует плазида группы несовместимости P-7. Анализ рестрикционных профилей показал наличие минимум трех плазмид в данном штамме. Штамм *Ochrobactrum* sp. 11 на данный момент является единственным представителем класса *Alphaproteobacteria*, содержащим плазмиду IncP-7.

Практическая значимость исследования

Результаты, полученные в рамках выполнения проекта могут быть использованы при проведении опытно-технологических разработок, направленных на создание технологии ремедиации нефтезагрязненных участков акватории Балтийского моря с использованием углеводородоокисляющих микроорганизмов, сочетающих в себе механические, физико-химические и биологические методы очистки.