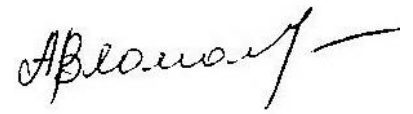


На правах рукописи



ЛОМАКИНА Анна Владимировна

**ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ В РАЙОНАХ
ЕСТЕСТВЕННЫХ ВЫХОДОВ НЕФТИ НА ОЗЕРЕ БАЙКАЛ**

03.00.16 - экология

03.00.07 - микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Улан-Удэ, 2010

Работа выполнена в лаборатории водной микробиологии Лимнологического института СО РАН г. Иркутска

- Научный руководитель:** доктор биологических наук,
в.н.с. Земская Тамара Ивановна
- Официальные оппоненты:** доктор биологических наук,
профессор Намсараев Баир Бадмабазарович
- кандидат биологических наук
Андреева Ирина Сергеевна
- Ведущая организация:** Институт экологии и генетики микроорганизмов
УрО РАН, г. Пермь

Защита состоится «25» марта 2010 г. в 15⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета Д 212.022.03 при Бурятском государственном университете по адресу: 670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а, биолого-географический факультет, конференц-зал. Факс: (3012)21-05-88, e-mail: d21202203@mail.ru, lomakina@lin.irk.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Бурятского государственного университета по адресу: 670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а.

Автореферат разослан «20» февраля 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических
наук



Н. А. Шорноева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследований. Известно, что решающую роль в трансформации нефти до простых соединений выполняют микроорганизмы (Квасников, Ключникова, 1981; Барышникова и др., 2001; Назина и др., 2002; Head et al., 2006; Muzyer et al., 2008), многие из которых способны разрушать углеводороды. Углеводородокисляющие микроорганизмы (УВОМ) широко распространены в природе, их пищевые потребности разнообразны, среди них нет узкоспециализированных форм (Шлегель, 1987). В настоящее время известно, что, по крайней мере, 79 родов бактерий, 9 родов цианобактерий, 103 рода грибов и 14 родов водорослей способны использовать нефть и ее производные в качестве единственного источника углерода и энергии (Head et al., 2006).

На озере Байкал различными методами идентифицированы грязевые вулканы, метановые и нефтяные сипы (Кузьмин и др., 1998; Клеркс и др., 2003; Конторович и др., 2007; Хлыстов и др., 2007). По оценкам А. Э. Конторовича с соавторами (2007), ежегодно из донных осадков районов естественных нефтепроявлений в воду озера Байкал поступает от 2 до 4 т. нефти. Несмотря на то, что нефть поступает на поверхность воды непрерывно, нефтяное пятно не увеличивается, что свидетельствует о ее биодegradации (Конторович и др., 2007; Хлыстов и др., 2007а). Районы нефтепроявлений на Байкале известны с XVIII века, тем не менее, исследования естественного микробного сообщества озера проводились лишь эпизодически (Талиев и др., 1985; Гоман и др., 1986; Петрова, Мамонтова, 1986; Павлова и др., 2008).

В связи с этим весьма актуально изучение распространения и определение численности УВОМ в комплексе с другими группами бактерий, а также исследование видового разнообразия микробного сообщества в разных по времени источниках формирования нефти и наличие ферментативных систем, обеспечивающих деградацию n-алканов в ультрапресном озере.

Цель работы: исследовать пространственно-временную и молекулярно-генетическую структуру микробных сообществ в двух районах естественных нефтепроявлений на озере Байкал и оценить их способность к биодegradации n-алканов нефти.

Задачи:

1. Исследовать численность и распределение УВОМ способных использовать в качестве единственного источника углеводородов нефть и n-алканы в районах естественных выходов нефти на озере Байкал.

2. Изучить молекулярно-генетическое разнообразие культивируемых аэробных микроорганизмов, выделенных из воды и донных осадков и суммарного микробного сообщества в двух районах естественных нефтепроявлений на озере Байкал с использованием анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК.

3. Оценить способность природного микробного сообщества и чистых культур байкальских микроорганизмов, изолированных из воды м. Горевой Утес деградировать n-алканы нефти в условиях лабораторного моделирования.

4. Исследовать у чистых культур аэробных бактерий наличие *alk* генов, обеспечивающих биodeградацию углеводов с определенной длиной цепи.

Научная новизна. Впервые исследована численность микроорганизмов, способных деградировать нефть и n-алканы в районах естественных выходов нефти на озере Байкал. Установлено, что как в водной толще, так и в донных осадках по численности среди культивируемых микроорганизмов доминируют УВОМ. Показано, что распределение УВОМ определяется концентрацией углеводов в воде и донных осадках.

Впервые исследована генетическая структура природного микробного сообщества в двух районах естественных нефтепроявлений на озере Байкал. Среди культивируемых бактерий выявлены представители следующих родов: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Micromonospora*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Bosea*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Aeromonas*, *Kocuria*, *Enterobacter*, *Arthrobacter*, *Novosphingobium*, *Methylobacterium*, *Curtobacterium*, *Acidovorax*, *Acinetobacter*. А также некультивируемые представители филумов: *Clorobi*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Nitrosirae*, *Bacteroides*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*. Анализ нуклеотидных последовательностей *alk* генов показал, что у исследованных культивируемых УВОМ содержатся гены представителей р. *Rhodococcus*, ответственные за деградацию широкого спектра алканов.

В лабораторных условиях подтверждена способность чистых культур и природного микробного сообщества окислять n-алканы нефти.

Практическая значимость. Полученные данные свидетельствуют о способности микробного сообщества участвовать в биodeградации нефти и ее производных, что позволило оценить степень воздействия нового нефтепроявления на экосистему озера Байкал. Сформирована коллекция УВОМ, выделенных из двух районов нефтепроявлений, которая может быть использована в процессах биоремедиации. Результаты, данные по исследованию *alk* генов у культивируемого микробного сообщества, могут быть использованы для понимания механизмов окисления нефти и ее производных в природных экосистемах и при создании биотехнологических препаратов.

Положения, выносимые на защиту:

1. В районах естественных нефтепроявлений на озере Байкал обитает динамичное микробное сообщество, способное использовать углеводороды нефти в качестве единственного источника углерода и энергии. Состав культивируемого микробного сообщества в давно известном районе нефтепроявления отличается большим генетическим разнообразием представленных родов бактерий в сравнении с новым районом, где нефть является не биodeградируемой.

2. Чистые культуры аэробных микроорганизмов, выделенные из водной толщи и донных осадков и природное микробное сообщество, способны окислять n-алканы нефти в лабораторных условиях. УВОМ, выделенные из районов естественных нефтепроявлений, имеют различный набор *alk* генов, ответственных за деградацию нефти

Апробация работы и публикации. Результаты работы были представлены на следующих конференциях и симпозиумах: II международном Байкальском

микробиологическом симпозиуме «Микроорганизмы в экосистемах озер, рек и водохранилищ» (Иркутск – п. Листвянка, 2007); международном симпозиуме «Контроль и реабилитация окружающей среды: КРОС – 2008» (Томск, 2008); Научно-практическом семинаре молодых ученых и специалистов, приуроченном к проведению технологической экспедиции ООО 'ВНИИГАЗ' 'Байкальские гидраты' (Иркутск – п. Листвянка, 2008); XIX Гольдшмидт конференции (Давос, Швейцария, 2009); X съезде Гидробиологического общества при РАН (Владивосток, 2009), XVIII Международной школе морской геологии «Геология морей и океанов» (Москва, 2009). По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ, из них 2 статьи в рецензируемых журналах.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзорного анализа литературы, трех глав, изложенных на основании собственных исследований, заключения, выводов, списка использованной литературы (173 источников, из них 93 - зарубежных). Объем работы составляет __ страниц машинописного текста, включающего 13 таблиц, 43 рисунка.

Автор выражает благодарность и искреннюю признательность научному руководителю д.б.н. Земской Т. И., за постановку задач и помощь в проводимых исследованиях, а также к.б.н. Павловой О. Н., к.б.н. Шубенковой О. В., к.б.н. Черницыной С. М., к.х.н. Горшкову А. Г., Иванову В. Г., к.б.н. Морозову И. В., Хлыстову О. М., пилотам ГОА «Мир» за отбор проб воды и донных осадков, Фонду содействия сохранению озера Байкал и всем сотрудникам лаборатории водной микробиологии за оказанную помощь при выполнении работ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Интеграционных проектов СО РАН № 27, 58, программ Президиума РАН 18.10, 17.9, гранта РФФИ 08-05-00709-а.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Приведены литературные данные по истории изучения естественных нефтепроявлений на озере Байкал, где рассмотрен химический состав нефти и дана характеристика районов естественных нефтепроявлений. Представлены результаты исследования разнообразия УВОМ в воде и донных осадках различных экосистем мира. Рассмотрены механизмы окисления углеводородов нефти микроорганизмами и наличие определенных ферментативных систем, обеспечивающих деградацию нефти.

Глава 2. Объекты и методы исследования

За период исследования с 2004 по 2008 гг. было отобрано и проанализировано более 1500 проб воды и донных отложений в двух районах естественных нефтепроявлений на озере Байкал – в районе устья р. Большая Зеленовская и м. Горовой Утес.

Водные образцы отбирали с водной поверхности, покрытой нефтяной пленкой и свободной от нее, а также с глубины 25, 50, 100, 150, 500 м и придонного слоя системой батометров Rosetta по стандартной методике

(Романенко, Кузнецов, 1974). Отбор осадков осуществляли с помощью гравитационной трубы (GC) с пластиковым вкладышем, бентной трубкой (BC) и дночерпателем (Gr). Часть донных осадков из керна помещали в стерильные пакеты, которые помещали в жидкий азот до проведения молекулярных анализов в лаборатории, другую часть донных осадков использовали для учета численности и изолирования чистых культур УВОМ непосредственно в лаборатории на судне.

В 2008 г. кроме стандартных пробоотборников для получения образцов были использованы глубоководные обитаемые аппараты «Мир-1» и «Мир-2». В ходе погружений для молекулярных и микробиологических исследований отобраны образцы воды и донных осадков непосредственно в местах разгрузки нефти и газа, а также битумные постройки и нефть.

Микробиологические методы исследования. Для исследования численности микробных сообществ в районах естественных нефтепроявлений использовали минеральную среду, где в качестве единственного источника углерода добавляли нефть или алканы $C_{10}H_{22}$, $C_{12}H_{26}$, $C_{16}H_{34}$ (Raymond, 1961), 1 мл которых растирали по поверхности агаризованной среды. Учет органотрофных микроорганизмов проводили на рыбо-пептоном агаре, разбавленном в 10 раз (Горбенко, Дзюбан, 1992). Для определения численности микроорганизмов в донных осадках готовили суспензию, перемешивая 1 г донных отложений в 100 мл стерильной дистиллированной воды в течение 30 мин в колбах объемом 200 мл, затем проводили глубинный посев (1 мл исследуемой суспензии).

В 2008 г. в донных осадках естественного нефтепроявления м. Горевой Утес исследовано распределение анаэробных УВОМ. Для учета численности анаэробных УВОМ в донных осадках фильтровали 20 мл дистиллированной воды с 1 г осадка, который пропускали через фильтр с размером пор 0,45 мкм. Затем фильтр помещали на минеральную среду и инкубировали при 22°C в бескислородных условиях, используя пакеты (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, HiAnaeroGas Pack).

Родовой состав чистых культур аэробных УВОМ устанавливали на основании их морфологических признаков (Берджи, 1997). Всего было выделено 218 штаммов, у которых были исследованы следующие характеристики: размер и форма клеток, окраска по Граму, наличие спор, мицелия в соответствии с методиками (Родина, 1965; Романенко, Кузнецов, 1974). Для дальнейших молекулярно-биологических исследований было отобрано 69 штаммов, выделенных из водной толщи и донных осадков двух районов естественных нефтепроявлений на озере Байкал.

Суммарная ДНК района м. Горевой Утес, была выделена из 2 образцов донных осадков: из поверхностного окисленного слоя (0-5см) и из восстановленного слоя 180-190 см. Оба этих слоя содержали нефть. Для анализа использовали универсальные эубактериальные и архейные праймеры. Из двух проб донных осадков было получено 178 клонов байкальских донных микроорганизмов, для 87 из них определены нуклеотидные последовательности фрагмента гена 16S рРНК.

В районе устья р. Б. Зеленовская была выделена суммарная ДНК из 2 горизонтов осадка: из поверхностного окисленного слоя (0-3 см), содержащего нефть и из восстановленного слоя осадка, так же характеризующегося наличием нефти. Из этих образцов донных осадков с использованием универсальных зубактериальных праймеров было получено 215 клонов, для 66 из них определены нуклеотидные последовательности фрагментов гена 16S рРНК.

Выделение суммарной бактериальной ДНК и ДНК из чистых культур проводили по методу Рошель (Rochelle, 1992) с добавлением ТЕ-буфера и поливинилпирролидона (PVPP) для суммарной ДНК. Для синтеза фрагментов гена 16S рРНК использовали универсальные зубактериальные и архейные праймеры, а также 3 группы праймеров на *alk* гены. Фрагменты гена 16S рРНК суммарной ДНК, выделенной из донных осадков исследованных районов, длиной от 850 до 1300 нуклеотидов были клонированы в плазмидный вектор pGEM-T ("Promega"). Лигирование и трансформацию проводили согласно предложенной методике фирмы производителя. Идентификацию полученных фрагментов гена 16S рРНК чистых культур и природного микробного сообщества и *alk* генов чистых культур осуществляли с использованием программы BLAST software сервера NCBI, включающая GenBank, EMBL и DDBJ базы данных (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) (Altschul et al., 1997). Редактирование последовательностей проводили с помощью редактора BioEdit. Выравнивание последовательностей проводили с помощью программы CLUSTALW. Филогенетический анализ проводили с использованием программы MEGA версия 4.0, Neighbor-Joining кластерного метода и Kimura two-parameters алгоритма. Показатель достоверности порядка ветвления (в %) определяли на основании «bootstrap»-анализа 100 альтернативных деревьев.

Полученные в работе нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК были депонированы в GenBank под следующими номерами: EU443820-EU443829, EU449113-EU449122, EU487604-EU487613, EU496540-EU496554, EU521681-EU521688, EU581636-EU581637, FJ534524-FJ534533, FJ555263-555281.

Химические методы исследования. Дегградация нефти чистыми культурами УВОМ. В эксперименте использовались суточные культуры УВОМ, выращенные на среде РПА. Бактериальные клетки суспендировали в пробирке со стерильной водой, затем 1 мл взвеси помещали в стерильные флаконы объемом 250 мл со 100 мл стерильной байкальской воды и добавляли 50 мкл стерильной нефти (месторождение Югринское, Западная Сибирь).

Дегградация нефти природным микробным сообществом. В эксперименте использовали байкальскую воду с водной поверхности в районе нефтепроявления м. Горевой Утес на участках с нефтяными пятнами - непосредственно в зоне нефтяного пятна и за его пределами, а также на контрольной станции в районе Баргузинского залива. В экспериментальные стерильные колбы объемом 250 мл добавляли стерильную нефть в концентрации 25, 50, 100 и 125 мкл (месторождение Югринское, Западная Сибирь) к 100 мл байкальской воды (3 колбы для каждой концентрации нефти и каждой пробы поверхностной воды). В качестве контроля при дегградации нефти природным микробным сообществом и

чистыми культурами использовали смеси стерильной байкальской воды и нефти с соответствующими концентрациями. Опыты проводили при 4°C.

Прирост биомассы в экспериментальной среде оценивали с помощью изменения оптической плотности на приборе фотоколориметре КФК-2-УХЛ42 при длине волны 490 нм через определенные промежутки времени (0, 5, 15, 30, 36 сутки).

Определение содержания н-алканов в культуральной среде проводили по методике предложенной в статье О. Н. Павловой с соавторами (2008). Измерение содержания н-алканов в культуральной среде проводили на 0, 5, 15, 36 сутки. Массу н-алканов в эксперименте после культивирования штамма в течение фиксированного интервала времени рассчитывали как среднее значение для трех параллельных опытов.

ГЛАВА 3. Численность культивируемых УВОМ в водной толще и донных осадков двух районов естественных нефтепроявлений

Исследовано пространственное распределение культивируемых УВОМ, выращенных на 4 различных источниках углеводородов (нефть, декан, додекан и гексадекан) и микроорганизмов, окисляющих легко-минерализованные вещества (органотрофы).

Установлено, что численность УВОМ в давно известном районе естественного нефтепроявления у устья р. Б. Зеленовская в поверхностном слое водной толщи в исследованные года колеблется от 20 до 2000 кл/мл и определяется близостью к зоне разгрузки нефти. Подобная закономерность развития УВОМ характерна и для придонного слоя водной толщи. Здесь также количество УВОМ определялось близостью к зоне разгрузки и колебалось от 77 до 690 кл/мл. Соотношение УВОМ к органотрофам не превышало 0.2.

Наибольшая численность УВОМ и органотрофов в водной толще была зафиксирована в 2004 г. (до 2000 кл/мл), далее с 2005 г. по 2007 г. наблюдается снижение численности всех исследуемых групп микроорганизмов (до 20 кл/мл). На фоновой станции в 2005 г. не были обнаружены микроорганизмы, деградирующие нефть.

Вертикальное распределение УВОМ и органотрофов показало, что во все исследованные года увеличение численности микроорганизмов, окисляющих н-алканы и нефть, наблюдается на глубине 25-50 м (рис. 1), подобная закономерность характерна и для фоновых станций. По-видимому, это связано с развитием диатомовых водорослей. Показано, что диатомовые водоросли являются главными составляющими в образовании некоторых н-акланов нефти (Tolman, 1927; Ramachandra et al., 2009), и поэтому могут служить источником для развития таких микроорганизмов.

В поверхностных слоях воды у устья р. Б. Зеленовская доминируют нефтеокисляющие микроорганизмы (2004 и 2005 гг.), в 2006 г. и 2007 г. – окисляющие нефть и декан, соответственно.

Подобная закономерность развития УВОМ и органотрофов по вертикали характерна и для донных осадков данного района. Здесь также наибольшая численность УВОМ была отмечена в поверхностных слоях донных отложений и

варьировалась от 6×10^2 кл/г (2005 г.) до 300×10^2 кл/г (2007 г.), с глубиной керна численность уменьшается до единичных клеток на грамм осадка. Интересно отметить, что минимальные значения численности УВОМ и органотрофов были зафиксированы в 2005 г., что, скорее всего, обусловлено удаленностью от источника нефти.

В поверхностных слоях донных осадков у устья р. Б. Зеленовская доминируют нефтеокисляющие микроорганизмы (2004 и 2005 гг.), в 2006 г. и 2007 г. – окисляющие нефть и декан, соответственно. А в поверхностных слоях донных осадков доминируют микроорганизмы, окисляющие додекан во все исследованные года.

Таким образом, для района естественного нефтепроявления устья р. Б. Зеленовская наблюдается тенденция к снижению численности УВОМ.

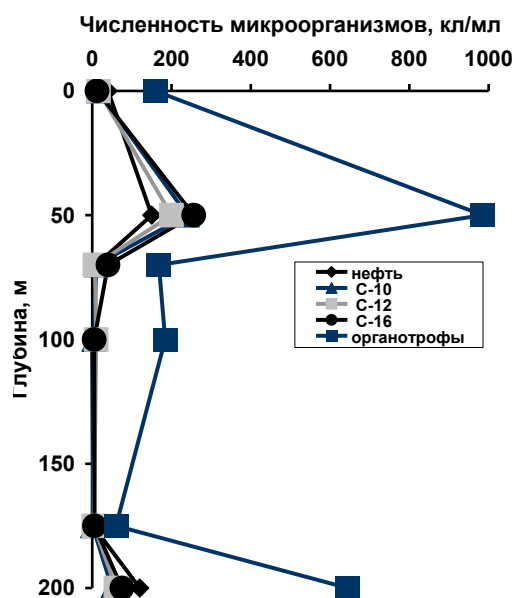


Рис. 1. Распределение микроорганизмов в водной толще устья р. Б. Зеленовская в 2005 г.

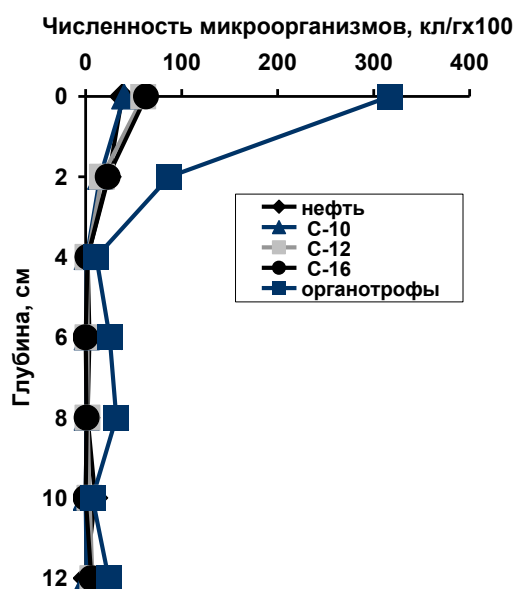


Рис. 2. Распределение микроорганизмов в донных осадках устья р. Б. Зеленовская в 2005 г.

Как и у давно известного нефтепроявления, у м. Горевой Утес также максимальные значения численности отмечены в поверхностных пробах воды вблизи нефтяной пленки и в придонных – в зоне разгрузки нефти. Микробиологические исследования распределения УВОМ и органотрофов в районе нового нефтепроявления у м. Горевой Утес начиная с 2005 по 2008 гг., показали, что, как и для старого района, численность УВОМ у м. Горевой Утес была максимальной в поверхностных слоях воды от 200 (в 2005 г.) до 1500 кл/мл (в 2007 г.). В придонных слоях воды наблюдалось увеличение численности УВОМ с 50 до 500 кл/мл (в 2007 г.). Вне зоны нефтяного пятна численность УВОМ минимальна, а органотрофов достигает 20-300 кл/мл.

Для нового района естественного нефтепроявления м. Горевой Утес характерно повышение численности микроорганизмов, использующих нефть и н-алканы в качестве единственного источника углерода и энергии в исследованный период с 2005 по 2007 гг., что связано с формированием в данный период времени динамичного микробного сообщества.

В 2008 г. придонные пробы воды у м. Горевой Утес были отобраны прицельно в зоне битумного вулкана с помощью «слэп-ганов», с использованием ГОА «Мир». Результаты проведенных исследований показали значительные различия численности УВОМ даже на небольшой площади (рис. 3).

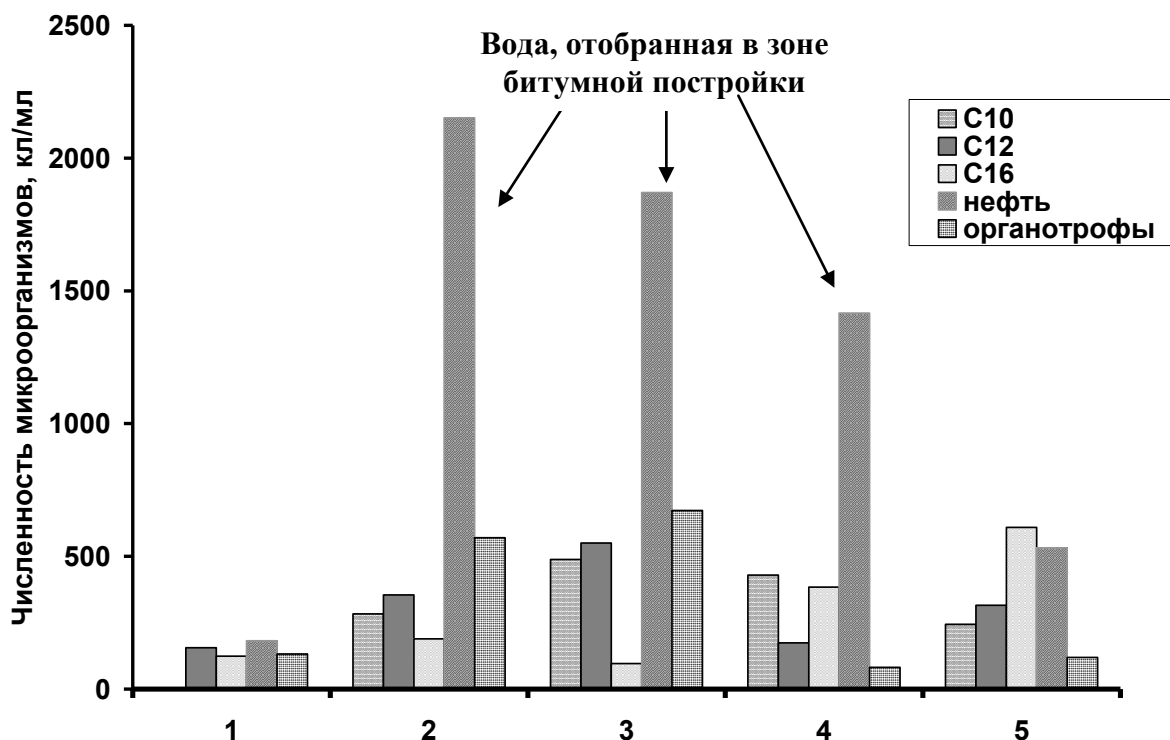


Рис. 3. Распределение микроорганизмов в придонном слое воды (860 м.), отобранных с помощью ГОА «Мир-1» (Горевой Утес, 10.08.08)

В пробах воды, отобранных с помощью «слэп-ганов» с различных битумных построек наблюдается доминирование УВОМ, окисляющие нефть, их численность составила 2152 кл/мл. Это гораздо выше численности микроорганизмов, окисляющих нефть в придонных пробах воды, отобранных с помощью батометров (500 кл/мл в 2007 г. и 8 кл/мл в 2008 г.). Это, скорее всего, обусловлено более высоким содержанием отдельных фракций нефти в донных осадках. Таким образом, в 2005 и 2006 гг. доминируют микроорганизмы, окисляющие гексадекан в поверхностном слое водной толщи и нефть в придонном, 2007 г. - использующих декан в поверхностных и придонных пробах воды.

Максимальные значения численности УВОМ как и для водной толщи отмечены в поверхностных горизонтах донных отложений. В 2005 г. количество УВОМ составило 4×10^2 кл/г, в 2006 – $90-100 \times 10^2$ кл/г, в 2007 – 224×10^2 кл/г. Численность УВОМ, окисляющих нефть в 2008 г. на уровне 2005-2007 гг., тем не менее, в пробах донных осадков, полученных из битумных вулканов с помощью

ГОА «Мир» численность достигала 1400×10^2 кл/г. Следует отметить, что в осадках м. Горевой Утес были обнаружены также гидраты метана вместе с нефтью. В слоях осадка с ГГ численность УВОМ превышала численность органотрофов в четыре раза (рис. 3). Аналогичное распределение было отмечено и для других кернов, обильно насыщенных метаном и нефтью. Подобное распределение нефтеокисляющих микроорганизмов по вертикали можно объяснить неравномерным поступлением нефти и газонасыщенного флюида.

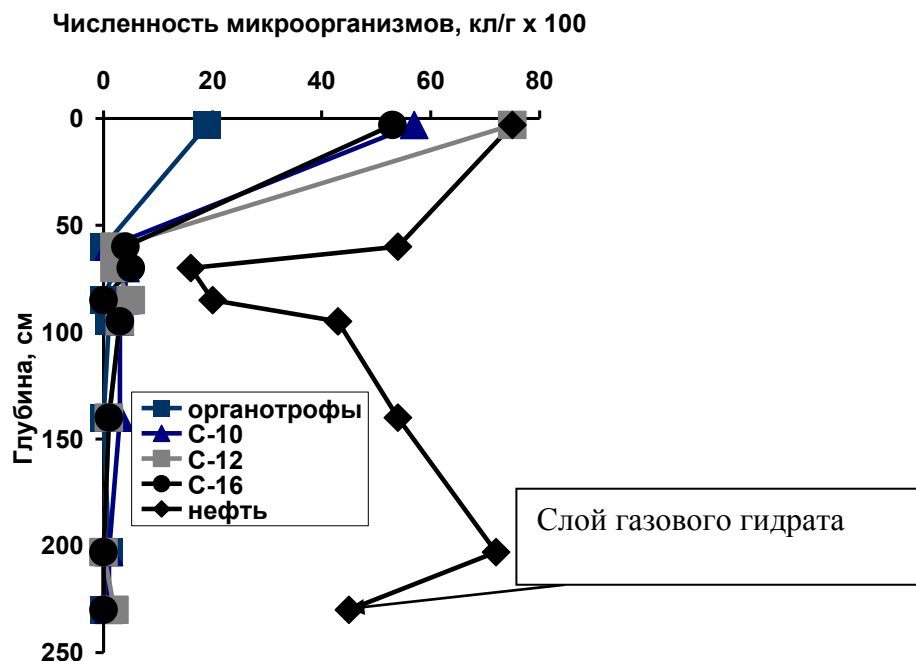


Рис. 3. Распределение аэробных микроорганизмов в донных осадках м. Горевой Утес в 2008 г (станция 7)

В 2008 г. была исследована численность анаэробных микроорганизмов, окисляющих нефть у м. Горевой Утес. Для учета численности анаэробных нефтеокисляющих микроорганизмов была использована одна синтетическая среда, которая, скорее всего, не позволила выявить весь спектр анаэробных микроорганизмов. Этим и объясняется невысокие количества бактерий, анаэробно окисляющих нефть (до 400 кл/г в поверхностных слоях донных отложений и до 30 кл/г в ниже лежащих слоях).

В донных осадках м. Горевой Утес в 2005 г и 2006 доминируют УВОМ, окисляющие n-алканы (декан и додекан), в 2007, 2008 гг. — окисляющие нефть.

Исследования, проведенные нами в районах естественных выходов нефти на озере Байкал, свидетельствуют о более высоких концентрациях УВОМ в зонах, содержащих углеводороды. Как правило, это поверхностные и придонные слои воды, а также поверхностные слои донных отложений. В ходе проведенных исследований отмечено уменьшение численности УВОМ в давно известном районе нефтепроявлений у устья р. Б. Зеленовская и увеличение УВОМ для нового нефтепроявления у м. Горевой Утес, с 2005 по 2007 гг. В 2008 г. численность УВОМ осталась на уровне 2007г., что может быть следствием стабилизации ситуации у м. Горевой Утес.

ГЛАВА 4. Молекулярно-генетическая идентификация углеводородокисляющих микроорганизмов

4.1. Филогенетическое разнообразие культивируемых УВОМ по данным анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК

По данным анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК чистые культуры УВОМ, выделенные из водной толщи двух районов естественных нефтепроявлений, принадлежат к разнообразным филогенетическим группам. В районе нефтепроявлений у устья р. Б. Зеленовская выявлены культивируемые представители α -, β -, γ -*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*. В районе естественного нефтепроявления у м. Горевой Утес кроме этих филогенетических групп получена одна последовательность (штамм 6), имеющая неопределенное положение, поскольку ближайшим гомологом является некультивируемая бактерия, филогенетическое положение которой остается неясным. Среди исследованных штаммов из этого района не обнаружены представители класса β -*Proteobacteria*. В донных осадках двух районах естественных нефтепроявлений на озере Байкал по фрагментам гена 16S рРНК выявлены представители филума *Firmicutes*, класса γ -*Proteobacteria*, а у м. Горевой Утес кроме этих филогенетических групп обнаружены представители филума *Actinobacteria*. Пятьдесят пять нуклеотидных последовательностей байкальских культивируемых бактерий имеют 98-99% сходства с ближайшими родственниками из международного банка данных, 14 менее 97% (рис. 4, 5).

Наиболее широко среди исследуемых бактерий представлен филум *Actinobacteria*. Представители рр. *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, принадлежащие к этому филуму, выявлены в районе м. Горевое Утеса. Нуклеотидная последовательность штамма 18 по результатам анализа фрагмента гена 16S рРНК имеет наибольший процент сходства с *Mycobacterium* sp. (99%), но, несмотря на высокий процент сходства на филогенетическом дереве данный штамм образует отдельную ветвь (рис. 4). Штамм 8, выделенный из водной толщи, показал наиболее высокий процент сходства с видом *Micromonospora chokoriensis* (99%), штамм 10 с видом *Micromonospora* sp. (98%). Среди штаммов, выделенных в районе устья р. Б. Зеленовская, пять, идентифицированы как представители р. *Micromonospora* с различной степенью сходства. Нуклеотидная последовательность штамма 51 имела 93% сходства с видом *Micromonospora mirobrigensis*, что не позволяет однозначно идентифицировать данный штамм как представителя р. *Micromonospora*. Филогенетический анализ показал, что штаммы этого рода (47, 51, 128), выделенные из разных районов, отличались по структуре и образовали на филогенетическом дереве отдельный кластер (рис. 5).

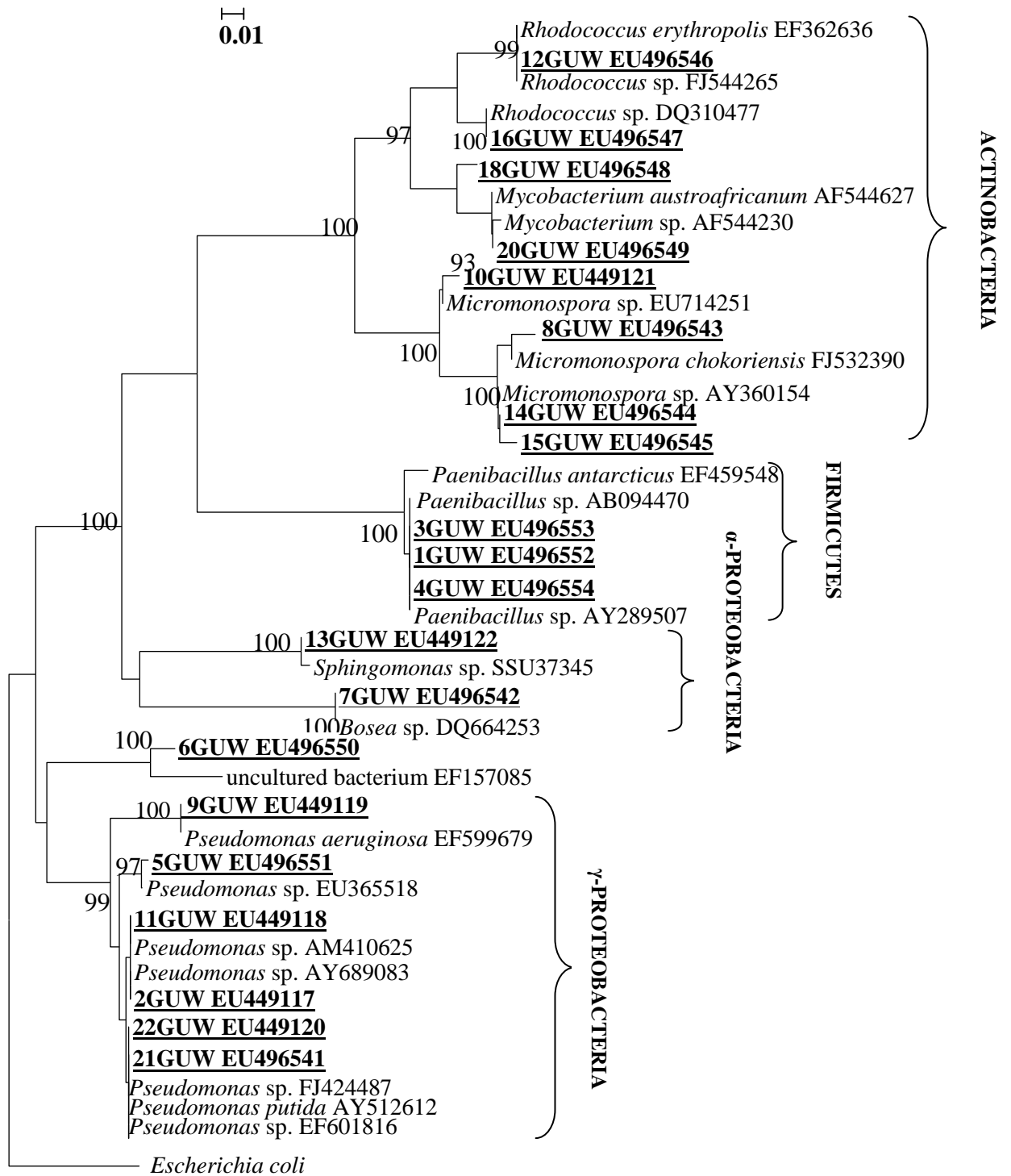


Рис. 4. Филогенетическое положение аэробных микроорганизмов, изолированных из водной толщи района естественного нефтепроявления озера Байкал у м. Горевой Утес. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность ветвления, определенная с помощью “bootstrap” анализа альтернативных деревьев. Значения менее 90 не указаны

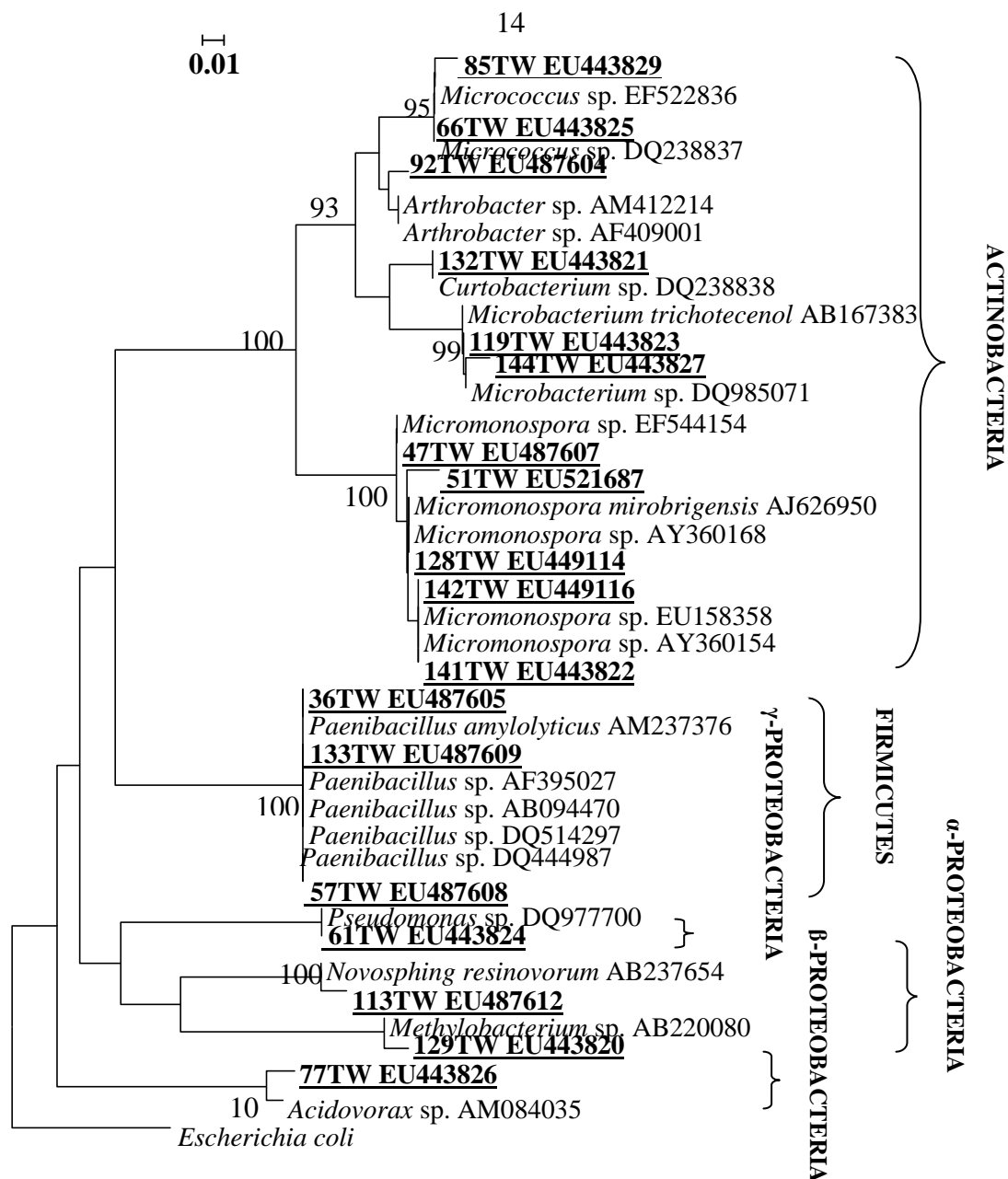


Рис. 5. Филогенетическое положение аэробных микроорганизмов, изолированных из водной толщи района естественного нефтепроявления озера Байкал у устья р. Б. Зеленовская. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность ветвления, определенная с помощью “bootstrap” анализа альтернативных деревьев. Значения менее 90 не указаны

УВОМ района устья р. Б. Зеленовская отличается большим разнообразием в сравнении с районом м. Горевой Утес. Возможно, это связано с тем, что из донных осадков у м. Горевой Утес поступает значительное количество нефти, а микробное сообщество на данный момент еще находится на стадии формирования.

Проведенный филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК показал, что культивируемые УВОМ отмеченных нами родов широко распространены в водных экосистемах, как пресноводных, так и морских, ближайшие родственники байкальских культивируемых УВОМ были изолированы из почв, загрязненных углеводородами.

Методом анализа структуры нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК показано доминирование в водной толще и донных осадках м. Горевой Утес представителей класса γ -*Proteobacteria* (р. *Pseudomonas*) и филума *Actinobacteria* (рр. *Rhodococcus*, *Micromonospora*), у устья р. Б. Зеленовская филумом *Firmicutes* (рр. *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*) и *Actinobacteria* (р. *Micromonospora*).

Таким образом, двух районах естественных нефтепроявлений обитают культивируемые аэробные бактерии, способные использовать в качестве единственного источника углерода и энергии углеводороды, тем самым способствуют деградации байкальской нефти.

4.2. Филогенетическое разнообразие природного микробного сообщества в районах естественных выходов нефти по данным анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рРНК

4.2.1. м. Горевой Утес. Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей двух исследованных горизонтов осадка у м. Горевой Утес показал, что состав микробного сообщества двух горизонтов донных осадков (окисленного и восстановленного) отличается.

Полученные нуклеотидные последовательности поверхностного окисленного горизонта донных осадков м. Горевой Утес отнесены к следующим филогенетическим группам: филумам *Proteobacteria* (классы β , γ , δ), *Verrucomicrobia*, *Nitrospirales*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Chlorobi* и *Actinobacteria*. Нуклеотидные последовательности, полученные из ДНК восстановленных донных осадков (180-190 см) были отнесены к следующим филумам: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* (α -, β -, γ -). Наиболее широко среди проанализированных последовательностей представлен филум протеобактерий. Кроме того, для 12 нуклеотидных последовательностей не был установлен филогенетический статус, поскольку их ближайшие гомологи имеют неопределенное положение. Процент сходства байкальских некультивируемых микроорганизмов из двух горизонтов донных осадков, с ближайшими гомологами из международного банка данных, составил 88-99%.

Анализ нуклеотидных последовательностей поверхностного (0-5 см) и восстановленного горизонтов (180-190 см), содержащих нефть показал, что большая часть полученных клонов сходна с некультивируемыми бактериям, изолированными из донных осадков различных рек и озер мира (Briee et al., 2007; Nercessian et al., 2005). Как в окисленных, так и в восстановленных осадках у м. Горевой Утес получены нуклеотидные последовательности сходные некультивируемым и культивируемым бактериям, выделенным из углеводородзагрязненных осадков, почв загрязненных нефтью (Winderl et al., 2008). Часть последовательностей участвует в окислении органических веществ, а также в окислении метана, как в аэробных, так и анаэробных условиях (Chen et al., 2008; Heijs et al., 2007). Одна нуклеотидная последовательность наиболее сходна uncultured *Magnetobacterium* sp., участвующей в окислении бензина при сульфатвосстановленных условиях (Kleinstauber et al., 2008). Следует отметить,

что среди представителей γ -*Proteobacteria* в поверхностном слое донных отложений были обнаружены нуклеотидные последовательности сходные метанотрофным бактериям рр. *Methylobacter* и *Methylomicrobium*, участвующие в окислении метана в арктической почве и содовом озере в Бурятии (Wartianen et al., 2006). Ранее нуклеотидные последовательности сходные метанотрофным бактериям I типа были получены при исследовании поверхностных горизонтов донных отложений грязевого вулкана «Маленький» (Шубенкова и др., 2005). Кроме того, получена одна последовательность из восстановленного донного слоя, ближайшим родственником которой является бактерия, выделенная из осадка, содержащего ГГ (залив Мехико) (Lanoil et al., 2001). Таким образом, некультивируемые бактерии донных осадков м. Горевой Утес играют важную роль в окислении n-алканов нефти, метана и других органических соединений.

В поверхностном слое донных отложений м. Горевой Утес был исследован архейный компонент. Филогенетический анализ показал, что байкальские археи из донных осадков м. Горевой Утес относятся к царствам *Euryarchaeota* и *Crenarchaeota*. Установлено, что большинство клонов относится к царству *Euryarchaeota*. Процент сходства с ближайшими гомологами из международного банка данных составил 88-99. Филогенетический анализ байкальских архей показал, что их ближайшие гомологи были выделены из природных сред, в том числе из донных осадков, водной толщи (Inagaki et al., 2003; Stein et al., 2001). Шесть нуклеотидных последовательностей наиболее сходны некультивируемым археям, участвующим в процессах окисления метана и нефти.

4.2.2. устье р. Б. Зеленовская. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК полученных клонов из окисленного и восстановленного слоев донных отложений у устья р. Б. Зеленовская показал, что их ближайшими гомологами являются представители филумов: *Proteobacteria*, (классы β -, γ -, δ -) *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*. Семь нуклеотидных последовательностей не была отнесена ни к одному из полученных филумов. Процент сходства, как и для осадков м. Горевой Утес с ближайшими родственниками из международного банка данных составил 88-99.

Филогенетический анализ показал, что ближайшими родственниками полученных нуклеотидных последовательностей являются бактерии, выделенные из почв различных регионов мира, из морской поверхностной воды, озера Бриана, озер, располагающихся в Канаде, Новой Зеландии, Японии, из образцов бактериальных матов (Мехико) (Ley et al., 2006). Одна нуклеотидная последовательность, полученная для поверхностного горизонта донных отложений, наиболее сходна метанооксилюющей бактерии, которые ранее были отмечены для поверхностного горизонта донных отложений (0-5 см) м. Горевой Утес. Также были детектированы различные филогенетические группы бактерий, участвующих в окислении n-алканов нефти и других органических соединений (Yamane et al., 2008).

Полученные результаты дают представление о биоразнообразии байкальских бактерий, полученных из донных осадков двух исследованных районов. Сравнение филогенетического разнообразия байкальских глубоководных

бактерий с нуклеотидными последовательностями бактерий из международного банка данных, показали, что наиболее разнообразный генетический состав получен для поверхностных и глубоководных слоев м. Горовой Утес и менее разнообразный для района устья р. Б. Зеленовская.

Исследование глубоководного слоя осадка устья р. Б. Зеленовская показало, менее разнообразный генетический состав микробного сообщества связан с тем, что нефть в донных осадках этого района является деградированной и в ней доминируют более тяжелые фракции нефти, которые способны разрушать лишь небольшое количество микроорганизмов

Филогенетический анализ показал, что некультивируемых бактерий, способных деградировать нефть и другие органические вещества больше в донных осадках м. Горовой Утес.

4.3. Исследование *alk* генов у культивируемых углеводородокисляющих микроорганизмов

Для исследования *alk* генов было отобрано 15 штаммов, которые по фрагменту гена 16S рРНК были отнесены к следующим филумам: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, классам α -, γ -*Proteobacteria*. Четыре штамма содержали *alkM* гены, у остальных штаммов УВОМ были детектированы в геноме *alkB* гены, ответственные за окисление широкого спектра н-алканов. Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей выявил сходство байкальских бактерий, содержащих *alk* гены с грамположительными бактериями р. *Rhodococcus*, и грамотрицательными бактериями р. *Pseudomonas* и *Acinetobacter*, у которых была расшифрована структура *alk* генов и которые участвуют в деградации нефти ее производных в различных экосистемах

Проведенное исследование показало, что большая часть штаммов по структуре нуклеотидных последовательностей *alkB* генов гораздо ближе к ДНК родококков, чем к собственной. Это может свидетельствовать о том, что *alkB* гены могли появиться в геноме различных родов бактерий в результате горизонтального межвидового переноса. Подобное предположение уже было выдвинуто ранее (van Weilen et al., 2001; Турова и др., 2008). Кроме того, известно, что *alk* гены являются адаптивными, то есть связанные с приспособлением к меняющимся условиям среды. Адаптивные гены не являются обязательными для всех представителей бактериальной популяции, они располагаются на плазмидах, что значительно повышает возможность их переноса между членами популяции, даже если эти члены не являются близкородственными (Турова, 2009).

alkM гены II группы, обеспечивающие окисление н-алканов с длиной цепи более C₁₂, были обнаружены только в геноме представителей р. *Acinetobacter*.

Таким образом, чистые культуры аэробных бактерий двух районов естественных нефтепроявлений обладают специфической ферментной системой, отвечающей за окисление н-алканов нефти.

ГЛАВА 5. Роль микроорганизмов в биodeградации нефти

5.1. Деградация нефти и ее производных в лабораторных условиях чистыми культурами

У пяти штаммов, изолированных из водной толщи естественного нефтепроявления м. Горевой Утес в лабораторных условиях была исследована динамика потребления н-алканов и их качественный состав. Для эксперимента были взяты штаммы *Pseudomonas* sp. (№5), *Pseudomonas fluorescens* (№11), *Mycobacterium* sp. (№18), показавшие положительную ПЦР-реакцию на III группу *alk* генов, один штамм *Bosea* sp. (№7) на I группу *alk* генов и один штамм *Pseudomonas* sp. (№1), на I и III группы *alk* генов. В результате проведенного эксперимента установлено, что штаммы потребляли н-алканы с разной интенсивностью (рис. 6).

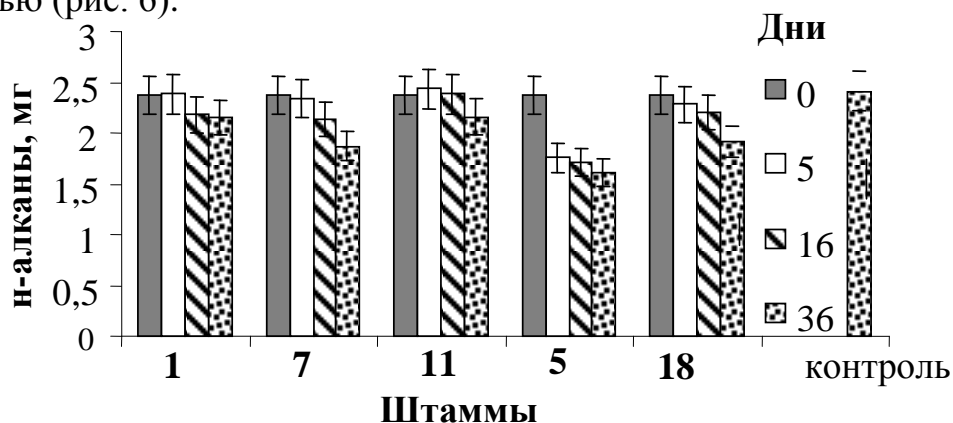


Рис. 6. Суммарное содержание н-алканов в экспериментальной среде

В результате проведенных экспериментов установлено, что представитель р. *Pseudomonas*, штамм *Pseudomonas* sp. (№5) окислял н-алканы более активно. За 36 суток эксперимента в присутствии данного штамма окислилось 35% алканов с длиной цепи C_{10} - C_{24} . При этом в среде не происходило накопления короткоцепочечных алканов, дает основание считать, что данный штамм окисляет их до более простых соединений.

Проведенные эксперименты с аэробными культивируемыми бактериями, изолированными из водной толщи м. Горевой Утес показали, что во всех случаях качественный состав н-алканов нефти за 36 суток не изменился, менялась лишь их доля в общей сумме углеводородов. Активность деградации н-алканов нефти бактериями не зависела также от их принадлежности к определенному роду и филуму. Анализ полученных экспериментальных данных свидетельствует, что не всегда штаммы, выделенные на среде с определенным углеводородом, содержат *alk* гены, обеспечивающие деструкцию данного углеводорода. В некоторых случаях спектр используемых бактериями н-алканов в эксперименте был шире, чем набор детектируемых у них с помощью праймеров ферментных систем. Эти результаты в определенной степени могут свидетельствовать о существовании альтернативных систем окисления алканов, которые нами не исследовались.

5.2. Деградация нефти и ее производных в лабораторных условиях природным микробным сообществом

Эксперименты по деградации н-алканов нефти, проведенные с природным микробным сообществом показали, что наиболее активно в процессе деградации н-алканов микробное сообщество, отобранное из нефтяного пятна естественного

нефтепроявления м. Горевой Утес. За первые 15 суток эксперимента уменьшение н-алканов не превышало 2.0 – 2.5 мкг/мл, что, очевидно, связано с формированием в этот период микробного сообщества, способного деградировать нефть и ее производные. В дальнейшем нефтеразрушающая способность микробного сообщества, отобранного в зоне нефтяного пятна, резко возрастает и через 35-60 суток конверсия н-алканов достигает 84-90%, причем количество внесенных н-алканов нефти в начале эксперимента не влияют на способность микробного сообщества деградировать нефть (рис. 7).

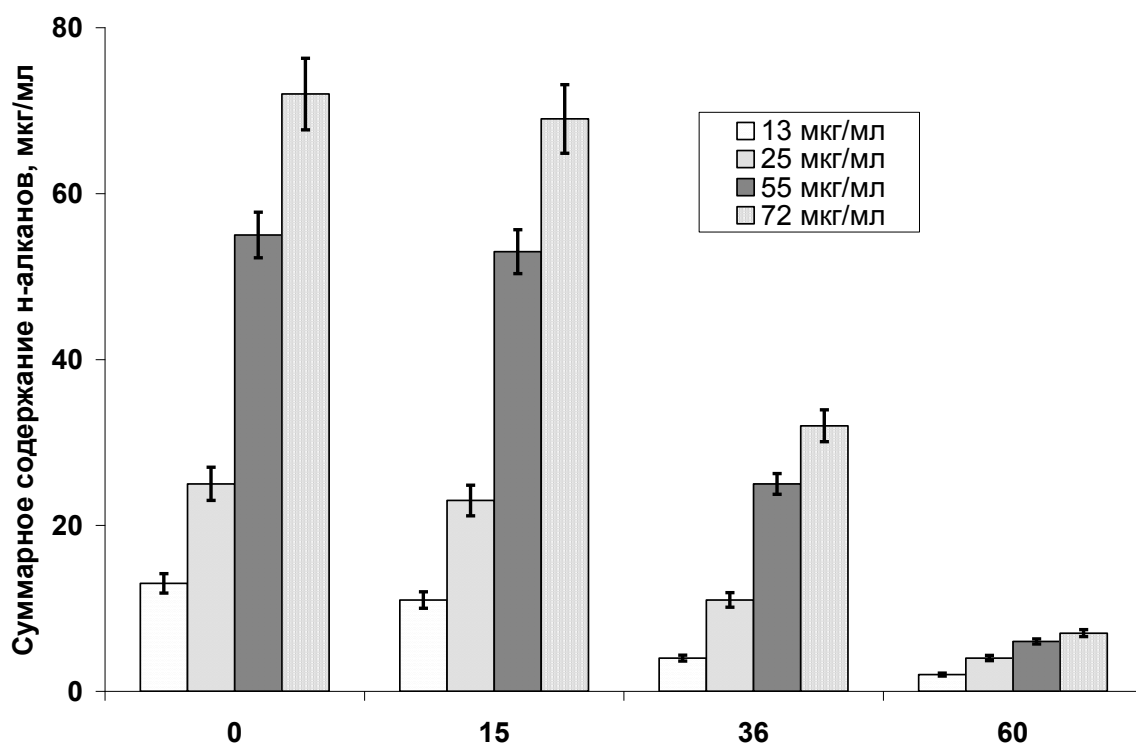


Рис. 7. Содержание н-алканов в смесях в начале модельного эксперимента и их уменьшение в течение 60 суток. Вода отобрана в районе нефтепроявления м. Горевой Утес в зоне нефтяного пятна. Количество н-алканов в добавленной нефти (мкг/мл): 1 – 13, 2 – 25, 3 – 55 и 4 – 72

Более длительный период в процессе биодеструкции отмечен в экспериментах с использованием воды, отобранной в районе естественных нефтепроявлений, но за пределами нефтяного пятна. В последнем случае за 60 суток конверсия не превышала 50% и зависела от количества добавленной нефти.

На фоновой станции вблизи Баргузинского залива уменьшение н-алканов за 60 суток эксперимента было незначительным и не превышало 35%.

Таким образом, экспериментально подтверждена способность чистых культур и природного микробного сообщества использовать нефть в качестве единственного источника углерода и энергии. Среди исследованных штаммов наиболее активным является *Pseudomonas* sp.. Наиболее активно разрушало н-алканы нефти природное микробное сообщество, отобранное в зоне нефтяного пятна, независимо от добавленных концентраций нефти в экспериментальные смеси.

ВЫВОДЫ

1. Содержание микроорганизмов в водной толще и донных осадках в зонах разгрузки нефти на озере Байкал на 1-2 порядка выше по сравнению с фоновыми районами. Численность УВОМ в поверхностных слоях воды у устья р. Б. Зеленовская составляла 1200-2600 кл/мл, для поверхностных слоев донных отложений – 470×10^2 кл/г. В районе нового нефтепроявления у м. Горевой Утес численность микроорганизмов, окисляющих нефть и н-алканы увеличилась с 500 кл/мл в 2005 г. до 4230 кл/мл в 2007 г. В 2008 г. численность этих групп микроорганизмов не увеличилась и осталась на уровне 2007 г.

2. Молекулярно-генетическое биоразнообразие культивируемых УВОМ как в давно известном, так и в новом районах нефтепроявлений представлено филумами *Proteobacteria* (классы α , β , γ), *Actinobacteria*, *Firmicutes*; в последнем районе не обнаружены представители класса β -*Proteobacteria*.

3. Молекулярно-генетическое биоразнообразие суммарного микробного сообщества в донных осадках у устья р. Большая Зеленовская представлено филумами *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*. У м. Горевой Утес кроме вышеперечисленных филумов обнаружены представители *Verrucomicrobia*, *Nitrosiriales*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadete*, *Acidobacteria* и *Chlorobi*. Филогенетический анализ байкальских архей показал, что они относятся к царству *Euryarhaeota* и *Crenarchaeota*.

4. В лабораторных экспериментах подтверждена способность культивируемого и природного микробного сообщества, из недавно открытого района естественного нефтепроявления, деградировать нефть и ее производные. Среди исследованных штаммов наиболее активно деградировал н-алканы штамм *Pseudomonas* sp. (5), процент конверсии н-алканов составил 35% за 36 суток эксперимента. Природное микробное сообщество за 60 суток деградировало н-алканы нефти на 90%.

5. Впервые у культивируемых УВОМ с помощью специфических праймеров детектированы *alk* гены, отвечающие за окисление широкого спектра н-алканов. В результате анализа структуры генов установлено, что большая часть культивируемых УВОМ из двух районов нефтепроявлений на озере Байкал содержит *alk* гены группы «*Rhodococcus*», которые, скорее всего, появились в геноме различных родов бактерий в результате горизонтального переноса. При этом донором этих генов, возможно, служили родококки.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах

1. Ломакина А. В., Павлова О. Н., Шубенкова О. В., Земская Т. И. Разнообразие культивируемых аэробных микроорганизмов в районах естественных выходов нефти на озере Байкал // Изв. РАН. Серия биологическая. – 2009. – №5. – С. 515-522.

2. Хлыстов О. М., Земская Т. И., Ситникова Т. Я., Механикова И. В., Кайгородова И. А. Горшков А. Г., Тимошкин О. А., Шубенкова О. В., Черницына С. М., Ломакина А. В., Лихошвай А. В., Сагалевич А. М., Москвин В. И., Пересыпкин В. И., Беляев Н. А., Слипечук М. В., член-корреспондент РАН

Тулохонов А. К., академик Грачев М. А. Донные битумные постройки и населяющая их биота по данным обследования озера Байкал с глубоководных обитаемых аппаратов «Мир» // ДАН. – 2009. – Т. 428. – №5. – С. 682-685.

Работы, опубликованные в материалах всероссийских и международных конференций

3. **Ломакина А. В.**, Шубенкова О. В., Павлова О. Н., Земская Т. И. Генетический анализ микроорганизмов из района естественного нефтепроявления на озере Байкал // II Международный Байкальский Микробиологический симпозиум «Микроорганизмы в экосистемах озер, рек и водохранилищ». – Иркутск. – 2007. – С. 145.

4. **Ломакина А. В.**, Земская Т. И., Павлова О. Н., Шубенкова О. В. Углекислородокисляющие микроорганизмы двух районов естественных нефтепроявлений на оз. Байкал // VI Международный симпозиум «Контроль и реабилитация окружающей среды». – Томск. – 2008. – С. 44-45.

5. Земская Т. И., **Ломакина А. В.**, Павлова О. Н. Изучение углекислородокисляющих микроорганизмов двух районов естественных нефтепроявлений на оз. Байкал // Научно-практический семинар молодых ученых и специалистов, приуроченных к проведению технологической экспедиции ООО «ВНИИГАЗ» «Байкальские гидраты». – Листвянка. – 2008. – С. 8.

6. **Lomakina A. V.**, Pavlova O. N. Gorshkov A. G., Zemskaya T. I. Hydrocarbon oxidizing microorganisms and their ability to degrade oil and its derivatives et natural oil seepage sites (Central Baikal) // 19th Annual V.M. Goldschmidt Conference Davos. Special Supplement Geochimica et cosmochimica acta. – 2009. – Switzerland. – P. A789.

7. Земская Т. И., Ситникова Т. Я., Шубенкова О. В., Черницына С. М., **Ломакина А. В.**, Павлова О. Н., Механикова И. В., Лихошвай А. В., Хлыстов О. М. Микробные сообщества и фауна холодных сипов и грязевых вулканов в осадках озера Байкал // X Съезд Гидробиологического сообщества при РАН. – 2009. – Владивосток. – С. 154-155.

8. **Ломакина А. В.**, Земская Т. И., Павлова О. Н., Шубенкова О. В., Горшков А. Г. Исследование углекислородокисляющих микроорганизмов и их способность деградировать нефть и ее производные в районах естественных выходов нефти на озере Байкал // XVIII Международная школа морской геологии «Геология морей и океанов». – 2009. – Москва. – С. 106-109.