

ПСИХРОТРОФНЫЕ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИЕ БАКТЕРИИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ДОННЫХ ОСАДКОВ ЗАЛИВА ПЕТРА ВЕЛИКОГО ЯПОНСКОГО МОРЯ

© 2022 г. Е. А. Богатыренко^{1, *}, А. В. Ким^{1, 2}, Н. С. Полоник⁴,
Т. И. Дункай^{1, 3}, А. Л. Пономарева⁴, Д. В. Дашков¹

¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

²ФНЦ Биоразнообразие ДВО РАН, Владивосток, Россия

³Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,
Владивосток, Россия

⁴Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН,
Владивосток, Россия

*e-mail: bogatyrenko.ea@dvfu.ru

Поступила в редакцию 23.04.2021 г.

После доработки 20.11.2021 г.

Принята к публикации 16.12.2021 г.

Из донных осадков залива Петра Великого Японского моря выделены 5 штаммов психротрофных углеводородоокисляющих бактерий, отнесенных к следующим видам или родам: *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus* sp., *Sphingomonas* sp., *Pseudomonas* sp. и *Alcanivorax* sp. Все исследуемые бактерии проявили высокую окислительную способность в отношении разложения *n*-алканов (C9–C27), фитана, пристана и полициклических ароматических углеводородов при температурах 5°C и 22°C. При этом при 5°C разложение углеводородов происходило интенсивнее. Несмотря на разную таксономическую принадлежность полученных микроорганизмов, все штаммы в первую очередь утилизировали коротко- (C9–C13) и длинноцепочечные (C21–27) алканы, а также полициклические ароматические углеводороды. Наибольшую углеводородоокисляющую активность продемонстрировал штамм *Rhodococcus erythropolis* AP_291, который за первую неделю эксперимента утилизировал более 50% всех углеводородов модельной смеси при 5°C.

Ключевые слова: психротрофы, углеводородоокисляющие бактерии, нефть, углеводороды, Японское море, алканы, полициклические углеводороды

DOI: 10.31857/S0030157422030029

Растущая во всем мире антропогенная нагрузка делает поиск микроорганизмов-деструкторов углеводородов и создание на их основе препаратов для ликвидации нефтяного загрязнения морской среды актуальной научной задачей [16, 46]. Подобные биопрепараты зарекомендовали себя как эффективные и наиболее экологичные средства очистки и восстановления морских экосистем [36]. Особый интерес представляет поиск психрофильных и психротолерантных углеводородоокисляющих микроорганизмов (УВОМ), способных эффективно осуществлять деструкцию компонентов нефти в условиях низких температур.

Исследования последних лет свидетельствуют о целесообразности использования для биоремедиации в каждом конкретном регионе аборигенных микроорганизмов, приспособленных к деградации углеводородов (УВ) в определенных экологических условиях. При этом они не явля-

ются генетически модифицированными и не оказывают токсичного действия на местную флору и фауну [40].

К числу наиболее распространенных в морской среде УВОМ относятся бактерии родов *Mycobacterium*, *Brevibacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus* и *Arthrobacter*, которых, как правило, выделяют из районов с сильным нефтяным загрязнением [1, 7, 8]. Довольно часто способность к окислению УВ встречается у *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Bacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus* и *Pseudomonas*. В морской воде, а также во льду были обнаружены углеводородоокисляющие (УВО) представители родов *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Marinobacter*, *Marinomonas*, *Oleispira* и *Shewanella* [32].

Информация об УВОМ дальневосточных морей в научной литературе практически отсутствует. В результате исследования микробиоты Бе-

рингова моря выявлена способность к деградации УВ у бактерий родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Pseudobacterium*, *Achromobacter*, *Bacterium*, *Brevibacterium* [6]. Среди нефтеокислителей Охотского моря обнаружены *Cobetia*, *Pseudoalteromonas*, *Oceanisphaera*, *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Marinomonas* и *Thalassospira* [14].

Для экосистемы Японского моря отмечается высокая степень антропогенного воздействия, связанная с увеличением численности населения, урбанизацией побережий, активным судоходством, индустриализацией и развитием туризма. На берегах залива Петра Великого, самого крупного залива российского побережья Японского моря, расположены порты г. Владивосток, г. Находка, г. Большой камень, пгт Посыет, а также специализированный морской нефтеналивной порт Козьмино. В большинстве прибрежных акваторий залива Петра Великого отмечается высокое содержание нефтяных УВ [4]. Проблема нефтяного загрязнения усугубляется действием низких температур в водах Японского моря большую часть года, что замедляет процессы окисления УВ. Так, среднегодовая температура поверхностных вод Японского моря составляет 12°C [2], а температура донных шельфовых вод редко поднимается выше 0°C [5].

Низкие температуры негативно влияют на скорость биоразложения нефти из-за уменьшения растворимости входящих в ее состав соединений. Подобные условия существования микроорганизмов ведут к снижению активности биохимических реакций, повышению вязкости среды, изменению текучести мембран и конформации белков. В ответ на понижение температуры психрофильные и психротрофные микроорганизмы выработали следующие адаптации: увеличение содержания в составе липидов мембран полиненасыщенных, короткоцепочечных и разветвленных жирных кислот; биосинтез криопротекторов и антифризных белков; продукцию белков теплового и холодового шока. Немаловажным приспособлением психрофильных углеводородокисляющих бактерий является синтез холодоактивных ферментов, а также биоэмульгаторов для уменьшения вязкости и поверхностного натяжения среды [33].

Несмотря на хроническое загрязнение Японского моря нефтепродуктами, УВО микробиота этого региона и ее участие в самоочищении экосистемы недостаточно изучены. Известно, что некоторые бактерии из поверхностных прибрежных вод Японии способны к окислению УВ: *Alcanivorax* [21, 25, 35, 41], *Pseudomonas aeruginosa* [15], *Sphingomonas subarctica* [25] и *Cycloclasticus pugetii* [35]. Однако, в современной научной литературе отсутствуют какие-либо сведения о таксономическом разнообразии и метаболическом потенциа-

ле психрофильных и психротрофных УВОМ Японского моря. В связи с этим целью настоящей работы являлось получение из донных осадков залива Петра Великого Японского моря культур психротрофных углеводородокисляющих бактерий, определение их таксономической принадлежности и оценка их способности к окислению нефтяных углеводородов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Район исследования и отбор проб. Материалом для работы послужили пробы верхнего окисленного слоя донных осадков залива Петра Великого Японского моря, полученные в 2018–2019 годах в ходе береговых экспедиций.

Образцы осадков получали, руководствуясь нормативными документами и методическими рекомендациями и требованиями к отбору проб донных отложений водных объектов для анализа на загрязненность [10]. С момента отбора и до начала исследований образцы хранились в морозильной камере при температуре –30°C.

Получение культур углеводородокисляющих бактерий. Для получения культур углеводородокисляющих бактерий (УВОБ) в качестве источника УВ использовали флотский мазут как один из наиболее характерных для антропогенного загрязнения морской среды нефтепродуктов. Для создания накопительных культур УВОБ донные осадки помещали в модифицированную минеральную среду Ворошиловой – Диановой со стерильным флотским мазутом (2.5%) в качестве единственного источника углерода и энергии [9]. Состав минеральной среды (г/л дистиллированной воды): NaCl – 10.0, NH₄NO₃ – 1.0, K₂HPO₄ – 1.0, KH₂PO₄ – 1.0, MgSO₄ – 0.2, CaCl₂ – 0.02, FeCl₂ – 2 капли насыщенного раствора. Инкубацию проводили в течение 30 сут при температуре 5°C. Для получения чистых культур УВОБ проводили высеивание на аналогичную агаризованную среду и выращивали их в тех же условиях. Для оценки способности полученных изолятов УВОБ к утилизации УВ при более высоких температурах проводили их инкубацию на плотной минеральной среде с мазутом при температуре 22°C в течение 10 сут.

Молекулярно-генетическая идентификация углеводородокисляющих бактерий и филогенетический анализ. Выделение из культур бактерий геномной ДНК проводили с помощью коммерческого набора “Genomic DNA purification kit” (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Фрагмент гена 16S рРНК амплифицировали с использованием пары праймеров 27F (5'–AGAGTTTGATCATGGCTCAG–3') и 1350R (5'–GACGGGCGGTGTGTACAAG–3') [30]. Продукты ПЦР реакций разделяли в агарозном

геле (1%) с добавлением этидиум бромид в электрофорезной камере. Продукты амплификации нужной длины вырезали из геля и экстрагировали путем замораживания при температуре -80°C (30 мин), затем центрифугирования при 13.4 тыс. об/мин. в течение 20 мин. Полученные ПЦР-продукты секвенировали по методу Сэнгера с помощью набора реактивов “Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit” (Thermo Fisher Scientific, США) на генетическом анализаторе “ABI 3500 Genetic Analyser” (Applied Biosystems, США) в ЦКП “Биотехнология и геновая инженерия” ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН.

Филогенетический анализ проводили путем анализа последовательностей генов 16S рРНК в международном банке данных (GenBank) с помощью программы BLAST [12] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Редактирование последовательностей проводили с помощью редактора BioEdit, для выравнивания последовательностей использовали алгоритм программы CLUSTAL W (<http://www.genebee.msu.su/clustal>). Филогенетическое дерево строили с использованием метода ближайших соседей (neighbor-joining) на основе алгоритма Kimura two-parameters в программе MEGA X [29]. Показатель достоверности порядка ветвления определяли на основании “bootstrap”-анализа 100 альтернативных деревьев. Нуклеотидные последовательности фрагментов гена 16S рРНК бактерий были депонированы в базе данных GenBank.

Оценка способности бактериальных штаммов к окислению углеводородов нефти. Модельная смесь УВ была приготовлена на основе коммерчески доступного летнего дизельного топлива сорта С, вид III (ДТ-Л-К5), ГОСТ Р 52368–2005 (ЕН 590:2009). В стерильном дизельном топливе объемом 1 л растворяли дополнительно 8 ммоль химически чистого нафталина, антрацена и фенантрена. Перед экспериментом модельная смесь УВ была повторно автоклавирована.

В стерильные пенициллиновые флаконы, содержащие 4650 мкл жидкой модифицированной среды Ворошиловой – Диановой и 300 мкл модельной смеси УВ, вносили по 50 мкл физиологического раствора с суточной культурой исследуемых бактерий (10^5 кл/мл). Флаконы закрывали резиновыми пробками и запаивали алюминиевыми крышками. Инкубацию проводили 70 сут при температуре 5°C и 28 сут при температуре 22°C . В качестве контроля вместо бактериальной суспензии использовали стерильный физиологический раствор. Все эксперименты повторяли трижды.

Экстракцию проводили с помощью трихлорметана (ХЧ, перегнанный) на 7, 14, 28 сут для всех образцов, а также на 70 сут – только для образцов, которые инкубировали при температуре 5°C . Из экстрактов отбирали аликвоты объемом 1 мл, ко-

торые перед проведением хромато-масс-спектрометрического анализа разбавляли трихлорметаном в 6 раз.

Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили на хромато-масс-спектрометре Shimadzu GCMS 2010 Ultra. Разделение компонентов осуществлялось на капиллярной колонке Ultra ALLOY-5 MS/HT (Frontier Lab., Япония; длина – 30 м, толщина фазы – 0.25 мкм, диаметр – 0.25 мм, фаза – 5% дифенил, 95% диметилполисилоксан). В качестве газа-носителя использовался гелий марки 6.0. Растворенный в хлороформе образец (1 мкл) с помощью автосэмплера вводился в инжектор, нагретый до температуры 230°C (режим – split, деление потока 1 : 40). Линейная скорость газа-носителя составляла 40 см/с, начальное давление газа – 66 кПа. Образцы хроматографировали в следующем режиме: изотермически в течение 7 мин при 40°C , при градиенте температуры от 40 до 270°C со скоростью нагрева $4^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, затем изотермически в течение 20 мин при 270°C . Температура ионного источника составляла 200°C , температура интерфейса масс-спектрометра – 270°C . Диапазон сканирования масс-спектрометра – от 35 до 600 а.е.м с ионизацией электронным ударом при 70 эВ. Масс-фрагментограммы регистрировались по полному ионному току и в режиме регистрации выбранных ионов для ПАУ ($m/z = 128$ для нафталина и $m/z = 178$ для антрацена и фенантрена, соответственно). Интерпретацию органических соединений проводили на основе сопоставления полученных масс-спектров с масс-спектрами соединений из библиотеки NIST 08. Содержание УВ выражено в процентах и рассчитано методом внутренней нормализации масс-фрагментограмм по полному ионному току (TIC) для алифатических алканов и в режиме регистрации выбранных ионов (SIM) для ПАУ (нафталин, антрацен, фенантрен).

Степень утилизации бактериями УВ выражали в процентах и оценивали по изменению концентрации компонентов модельной смеси УВ в процессе инкубации по отношению к исходным значениям. Численность микроорганизмов определяли в динамике методом окрашивания клеток флуорохромным красителем ДАФИ (4,6-диамино-2-фенилиндол) [39]. Подсчет клеток проводили под эпифлуоресцентным микроскопом Zeiss Axio Imager M1 с помощью программы Image Test.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение коллекции УВОБ из донных осадков Японского моря. В ходе исследований из донных осадков залива Петра Великого Японского моря были выделены и таксономически охарактеризованы 5 штаммов УВОБ, способных расти при температуре 5°C на среде с мазутом в качестве единственного источника углерода. Для исследу-

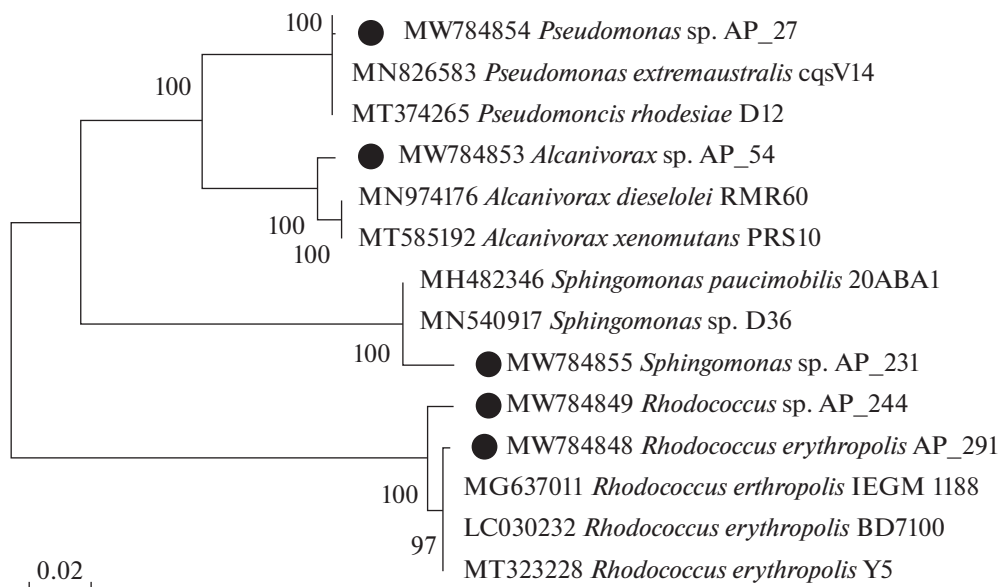


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа последовательностей фрагментов гена 16S рРНК психротрофных УВОБ из донных осадков Японского моря. Дендрограмма построена на основе алгоритма метода объединения ближайших соседей (NJ). Последовательности, полученные в данной работе, отмечены черным кружком. Масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 100 п. н. Представлены значения бутстреп поддержки выше 50%.

емых бактериальных штаммов был проведен филогенетический анализ путем поиска гомологичных последовательностей в международном банке данных (GenBank) и построено филогенетическое дерево (рис. 1).

Со станции, имеющей координаты 42°30' N, 132°41' E (глубина 174 м), было получено 2 штамма: *Sphingomonas* sp. AP_231 (MW784855) и *Rhodococcus* sp. AP_244 (MW784849). Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма *Sphingomonas* sp. AP_231 показала высокий процент сходства (98.20%) с *Sphingomonas paucimobilis* 20ABA1 (MH482346) и с *Sphingomonas* sp. D36 (MN540917). Ближайшим гомологом изолята *Rhodococcus* sp. AP_244 (98.79%) стал штамм *Rhodococcus erythropolis* IEGM 1188 (MG637011).

Еще один представитель родококков — штамм *Rhodococcus erythropolis* AP_291 (MW784848) был выделен из донных осадков станции с координатами: 42°39' N, 133°02' E (глубина 90 м). Указанная точка отбора пробы находится вблизи морского нефтеналивного порта Козьмино. Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК этого штамма показал наибольший процент сходства (99.53%) с *Rhodococcus erythropolis* BD7100 (LC030232).

Штамм *Pseudomonas* sp. AP_27 (MW784854) был выделен также из донных осадков в районе морского нефтеналивного порта Козьмино (42°34' N, 133°02' E, глубина 110 м). Исследуемый штамм имел одинаково высокий процент гомологии гена 16S рРНК (99.77%) с тремя разными

видами псевдомонад: *Pseudomonas extremaustralis* cqsV14 (MN826583), *Pseudomonas marginalis* PMK1 (MT583077) и *Pseudomonas rhodesiae* D12 (MT374265).

Штамм *Alcanivorax* sp. AP_54 (MW784853) был выделен со станции, имеющей координаты 42°41' N, 132°27' E (глубина 82 м). Изолят имел одинаковый процент сходства генов 16S рРНК (98.40%) с *Alcanivorax dieselolei* RMR60 (MN974176) и с *Alcanivorax xenomutans* Y50-2 (MT585192).

Оценка способности бактериальных штаммов к окислению углеводородов нефти. Для полученных 5 бактериальных штаммов в течение 70 сут проводилась оценка динамики утилизации ими УВ модельной смеси при температуре 5°C. Уже к 7 сут эксперимента наблюдалось заметное уменьшение концентрации УВ во всех пробах (табл. 1). Наибольшие значения УВО активности были зафиксированы для штамма *Rhodococcus erythropolis* AP_291 (рис. 2). За неделю клетки бактерий этого штамма разложили более 50% всех УВ смеси. Лучше всего подверглись окислению алканы C9—C14 и C18—C27, а также все ПАУ. Несколько хуже бактерии утилизировали УВ с длиной углеродной цепи 15—17 атомов и пристан.

Также относительно высокую ферментативную активность продемонстрировал штамм *Pseudomonas* sp. AP_27. Как и в случае со штаммом *Rhodococcus erythropolis* AP_291, псевдомонады более эффективно окисляли коротко- и длинноцепочечные алканы, а также нафталин и антрацен. Гораздо хуже подверглись утилизации алканы C15—C19 (25% и менее), пристан (21%),

Таблица 1. Степень утилизации УВ (%) при температуре 5°C по отношению к исходным концентрациям УВ в модельной смеси

Углеводород	<i>Rhodococcus erythropolis</i> AP_291					<i>Rhodococcus</i> sp. AP_244					<i>Alcanivorax</i> sp. AP_54					<i>Pseudomonas</i> sp. AP_27					<i>Sphingomonas</i> sp. AP_231				
	7 сут	14 сут	28 сут	70 сут		7 сут	14 сут	28 сут	70 сут		7 сут	14 сут	28 сут	70 сут		7 сут	14 сут	28 сут	70 сут		7 сут	14 сут	28 сут	70 сут	
Нонан (C9)	73 ± 4	76 ± 3	82 ± 4	100		51 ± 3	75 ± 2	77 ± 2	100		50 ± 2	71 ± 2	79 ± 3	100		64 ± 2	65 ± 2	76 ± 3	100		55 ± 4	60 ± 2	68 ± 2	100	
Декан (C10)	66 ± 3	72 ± 2	73 ± 2	73 ± 3		54 ± 4	70 ± 1	63 ± 5	72 ± 1		47 ± 3	64 ± 2	67 ± 2	67 ± 2		60 ± 2	62 ± 3	63 ± 3	60 ± 3		51 ± 4	54 ± 2	57 ± 2	68 ± 2	
Ундекан (C11)	70 ± 2	73 ± 1	73 ± 0	71 ± 3		44 ± 2	62 ± 3	64 ± 3	72 ± 3		33 ± 3	57 ± 0	68 ± 3	67 ± 3		53 ± 2	58 ± 4	63 ± 2	62 ± 1		50 ± 2	56 ± 2	51 ± 2	67 ± 4	
Додекан (C12)	59 ± 1	59 ± 2	65 ± 2	63 ± 2		35 ± 4	52 ± 2	57 ± 3	64 ± 3		25 ± 5	58 ± 2	60 ± 3	68 ± 2		43 ± 2	49 ± 2	56 ± 4	52 ± 2		42 ± 2	43 ± 1	45 ± 3	61 ± 2	
Тридекан (C13)	61 ± 2	62 ± 2	63 ± 3	61 ± 2		29 ± 4	62 ± 2	56 ± 4	63 ± 2		17 ± 4	59 ± 1	59 ± 1	58 ± 2		34 ± 3	41 ± 2	53 ± 4	49 ± 2		38 ± 3	43 ± 2	42 ± 2	54 ± 4	
Тетрадекан (C14)	59 ± 1	58 ± 1	61 ± 2	60 ± 3		21 ± 3	58 ± 2	53 ± 5	61 ± 2		11 ± 3	57 ± 1	57 ± 0	54 ± 2		29 ± 2	29 ± 2	50 ± 4	49 ± 2		24 ± 2	39 ± 0	39 ± 2	52 ± 2	
Пентадекан (C15)	49 ± 3	53 ± 2	59 ± 3	60 ± 4		12 ± 1	48 ± 4	51 ± 2	52 ± 1		6 ± 2	47 ± 3	56 ± 2	54 ± 2		22 ± 3	37 ± 3	48 ± 0	48 ± 2		21 ± 2	28 ± 3	37 ± 2	50 ± 3	
Гексадекан (C16)	38 ± 2	46 ± 2	53 ± 3	57 ± 2		9 ± 3	34 ± 3	46 ± 4	45 ± 4		11 ± 2	38 ± 3	56 ± 2	53 ± 2		21 ± 3	36 ± 3	48 ± 5	42 ± 2		26 ± 4	25 ± 4	40 ± 3	48 ± 3	
Гептадекан (C17)	48 ± 2	51 ± 2	62 ± 3	68 ± 2		0	53 ± 1	53 ± 0	55 ± 1		13 ± 2	58 ± 2	60 ± 2	63 ± 2		23 ± 3	39 ± 3	46 ± 5	55 ± 2		21 ± 3	31 ± 2	39 ± 2	60 ± 4	
Пристан	36 ± 2	48 ± 3	55 ± 1	59 ± 0		0	27 ± 4	46 ± 2	49 ± 2		3 ± 1	41 ± 3	63 ± 2	65 ± 2		21 ± 3	32 ± 1	41 ± 1	43 ± 1		20 ± 4	32 ± 3	36 ± 2	53 ± 5	
Октадекан (C18)	56 ± 2	55 ± 2	55 ± 0	64 ± 1		0	30 ± 2	47 ± 3	51 ± 3		11 ± 2	47 ± 3	53 ± 2	50 ± 2		21 ± 4	38 ± 3	43 ± 2	49 ± 2		22 ± 1	23 ± 1	32 ± 1	59 ± 3	
Фитан	56 ± 1	58 ± 1	59 ± 1	61 ± 4		3 ± 1	36 ± 4	45 ± 2	50 ± 2		14 ± 2	51 ± 2	55 ± 2	57 ± 2		23 ± 1	38 ± 3	43 ± 2	48 ± 2		23 ± 2	26 ± 2	36 ± 3	55 ± 2	
Нонадекан (C19)	54 ± 2	59 ± 2	57 ± 2	64 ± 1		0	34 ± 3	48 ± 4	54 ± 2		16 ± 2	45 ± 4	53 ± 2	54 ± 1		25 ± 3	31 ± 2	45 ± 2	51 ± 1		19 ± 1	29 ± 1	34 ± 2	62 ± 3	
Эйкозан (C20)	56 ± 2	60 ± 2	59 ± 2	67 ± 3		5 ± 1	24 ± 2	50 ± 2	60 ± 3		24 ± 4	54 ± 3	59 ± 2	60 ± 2		35 ± 3	39 ± 2	48 ± 1	58 ± 2		25 ± 2	34 ± 2	39 ± 2	67 ± 4	
Генэйкозан (C21)	55 ± 2	62 ± 2	64 ± 3	72 ± 1		19 ± 2	31 ± 2	56 ± 2	68 ± 3		34 ± 1	56 ± 2	63 ± 1	57 ± 5		41 ± 2	54 ± 2	57 ± 2	63 ± 2		33 ± 1	34 ± 2	48 ± 2	70 ± 4	
Докозан (C22)	57 ± 1	60 ± 2	69 ± 2	75 ± 3		29 ± 3	44 ± 1	64 ± 2	71 ± 3		42 ± 1	51 ± 2	67 ± 3	64 ± 4		50 ± 1	52 ± 1	59 ± 1	70 ± 2		40 ± 2	45 ± 2	55 ± 2	76 ± 2	
Трикозан (C23)	60 ± 2	64 ± 2	71 ± 1	80 ± 2		31 ± 3	46 ± 3	65 ± 1	70 ± 1		43 ± 2	52 ± 2	68 ± 2	67 ± 2		55 ± 1	56 ± 1	63 ± 2	70 ± 3		41 ± 2	54 ± 2	55 ± 3	78 ± 2	
Тетракозан (C24)	60 ± 0	62 ± 2	77 ± 2	83 ± 2		43 ± 2	48 ± 1	75 ± 3	80 ± 1		55 ± 1	64 ± 2	76 ± 2	75 ± 2		67 ± 2	69 ± 2	72 ± 2	79 ± 3		44 ± 3	47 ± 4	65 ± 2	85 ± 3	
Пентакозан (C25)	61 ± 2	65 ± 2	74 ± 1	81 ± 3		43 ± 2	53 ± 2	73 ± 3	77 ± 3		54 ± 2	67 ± 2	73 ± 2	70 ± 3		65 ± 1	65 ± 1	68 ± 2	80 ± 4		38 ± 2	54 ± 2	59 ± 3	80 ± 3	
Гексакозан (C26)	67 ± 0	67 ± 0	75 ± 2	82 ± 3		39 ± 2	59 ± 2	74 ± 2	75 ± 2		56 ± 3	66 ± 3	76 ± 2	75 ± 2		68 ± 2	69 ± 2	71 ± 2	82 ± 3		36 ± 2	45 ± 2	58 ± 1	76 ± 3	
Гептакозан (C27)	65 ± 2	65 ± 1	71 ± 3	78 ± 2		38 ± 4	59 ± 2	69 ± 3	75 ± 2		56 ± 2	64 ± 1	74 ± 0	71 ± 0		67 ± 2	67 ± 2	65 ± 2	81 ± 2		32 ± 2	47 ± 2	58 ± 2	76 ± 1	
Нафталин	86 ± 2	90 ± 2	91 ± 0	91 ± 3		70 ± 3	83 ± 3	91 ± 2	89 ± 1		64 ± 2	86 ± 3	81 ± 2	82 ± 1		76 ± 3	81 ± 1	88 ± 2	83 ± 1		82 ± 2	85 ± 3	79 ± 2	88 ± 4	
Антрацен	58 ± 2	61 ± 2	80 ± 2	80 ± 2		35 ± 3	71 ± 2	73 ± 1	72 ± 3		44 ± 2	66 ± 3	73 ± 0	67 ± 5		37 ± 3	56 ± 2	71 ± 2	68 ± 3		67 ± 2	71 ± 3	68 ± 2	77 ± 2	
Фенантрэн	54 ± 2	57 ± 0	74 ± 4	85 ± 1		12 ± 2	66 ± 2	71 ± 2	78 ± 3		18 ± 3	55 ± 3	78 ± 2	72 ± 5		10 ± 2	45 ± 3	66 ± 3	77 ± 2		57 ± 3	73 ± 2	64 ± 2	74 ± 1	

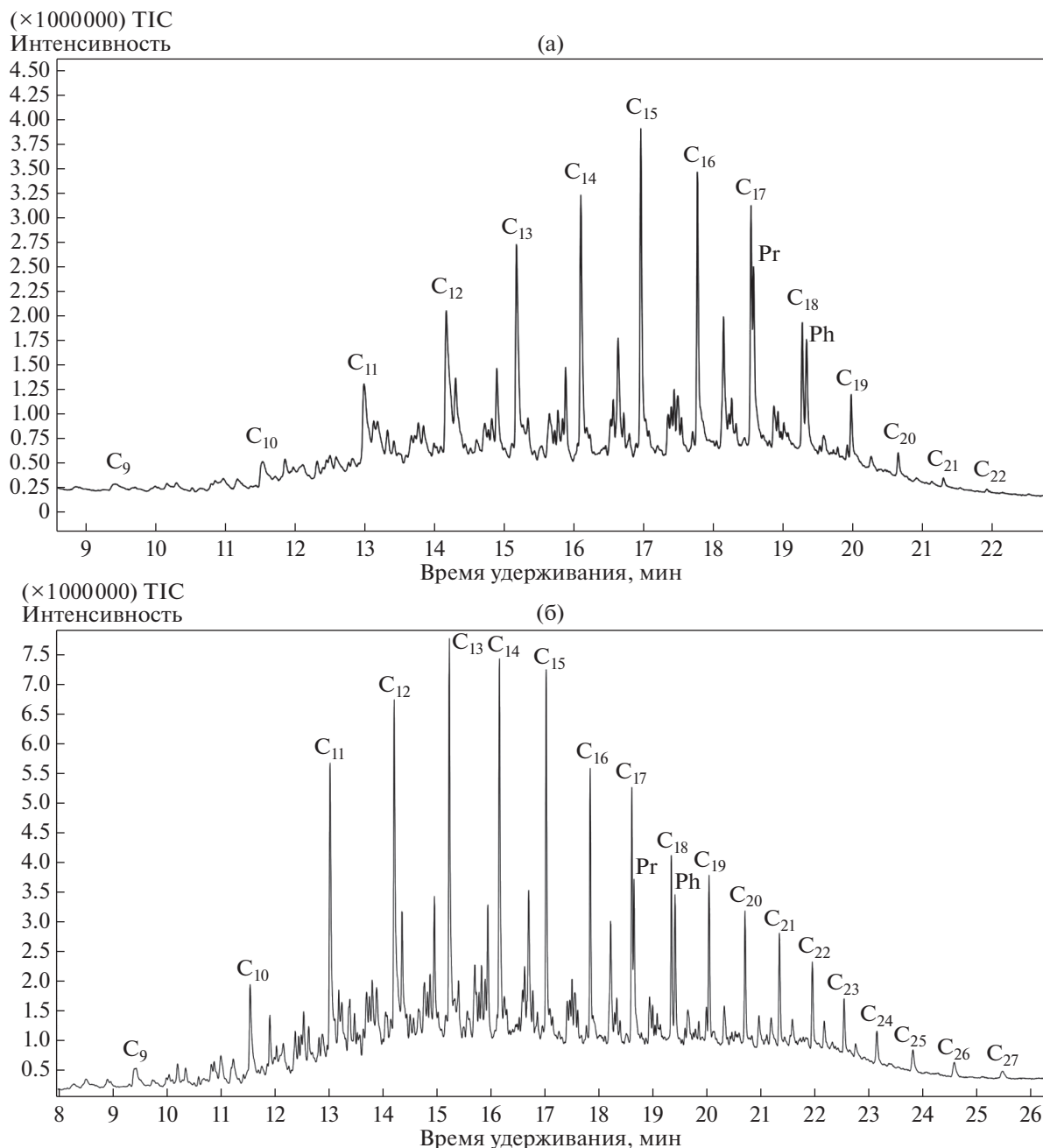


Рис. 2. Масс-фрагментогаммы состава модельной смеси УВ на 7 сут эксперимента при 5°C: (а) штамм *Rhodococcus erythropolis* AP_291; (б) контроль.

Условные обозначения: C₉–C₂₇ – *n*-алканы с соответствующей длиной углеродной цепи, Pr – пристан, Ph – фитан.

фитан (23%) и фенантрен (10%). Интересно отметить, что оба обсуждаемых штамма были выделены с соседних станций, расположенных вблизи нефтеналивного порта Козьмино.

Что касается остальных штаммов, то, несмотря на более низкие значения утилизации УВ в первую неделю эксперимента, для всех них отмечались схожие тенденции по предпочтению окисляемых субстратов. Из алканов в первую очередь разложению подверглись УВ с длиной углерод-

ной цепи 9–13 и 21–27 атомов. Из ПАУ лучше всего все штаммы разлагали нафталин (до 82%) и антрацен (до 67%). Фенантрен оказался менее предпочтительным УВ, особенно для штаммов *Rhodococcus* sp. AP_244 и *Alcanivorax* sp. AP_54 (степень утилизации 12 и 18% соответственно). Алканы C₁₄–C₂₀, включая фитан и пристан, практически не использовались бактериями в первую неделю опыта (степень утилизации составила 0–25%).

Хромато-масс-спектрометрический анализ проб на 14 сут эксперимента для штаммов *Rhodococcus* sp. AP_244 и *Alcanivorax* sp. AP_54 показал резкое увеличение потребления всех компонентов модельной смеси, включая C14–C20 и фенантрен. Для остальных штаммов степень утилизации всех УВ увеличивалась более плавно по сравнению с предыдущей неделей. Необходимо отметить, что все штаммы, кроме *Sphingomonas* sp. AP_231, окислили большую часть исследуемых УВ к 28 сут наблюдения. На 70 сут эксперимента не было зафиксировано существенной разницы в степени утилизации УВ по сравнению с данными, полученными на 28 сут. В то же время, штамм *Sphingomonas* sp. AP_231 до 70 сут наблюдения продолжал активно окислять УВ смеси. Таким образом, для всех исследуемых микробных штаммов к окончанию эксперимента убыль отдельных алканов составила 43–100%, а убыль ПАУ – 67–91%.

Динамика численности микробных клеток в ходе эксперимента коррелировала со степенью утилизации УВ среды. Так на 7 сут опыта для наиболее активных штаммов *Rhodococcus erythropolis* AP_291 и *Pseudomonas* sp. AP_27 численность возросла с 10^3 до 10^5 кл/мл, для остальных штаммов численность увеличилась до 10^4 кл/мл. На 14 сут численность клеток *Rhodococcus* sp. AP_244, *Sphingomonas* sp. AP_231 и *Alcanivorax* sp. AP_54 увеличилась с 10^4 кл/мл до 10^5 кл/мл, что отразилось в резком потреблении УВ с 7 по 14 сут. Численность же *Rhodococcus erythropolis* AP_291 и *Pseudomonas* sp. AP_27 за неделю не изменилась. На 28 сут количество клеток во всех образцах уменьшилось с 10^5 кл/мл до 10^4 кл/мл и оставалось таким до окончания наблюдений.

На следующем этапе работы для оценки способности нашей коллекции УВОБ к утилизации УВ при более высоких температурах проводили их инкубацию на плотной минеральной среде с мазутом при температуре 22°C в течение 10 сут. Установлено, что все изучаемые микроорганизмы росли при заданных условиях. В связи с этим, оценка динамики потребления бактериями отдельных УВ методом хромато-масс-спектрометрии была проведена и при температуре 22°C (табл. 2).

Результаты анализа показали, что хуже всех утилизацию УВ осуществлял штамм *Rhodococcus erythropolis* AP_291, который ранее продемонстрировал самую высокую УВО активность при температуре 5°C. При повышении температуры процесс окисления УВ этим штаммом существенно замедлился. Остальные 4 бактериальных штамма разлагали УВ с такой же или меньшей интенсивностью, чем при температуре 5°C.

Для всех исследуемых культур бактерий отмечалась та же избирательность в выборе окисляемых субстратов, как и при низкой температуре.

Лучше всего бактерии разлагали коротко- и длинноцепочечные алканы, а также ПАУ, хуже всего – УВ с длиной углеродной цепи 15–19 атомов. Из ПАУ микроорганизмы в первую очередь окисляли нафталин и антрацен, а в последующие сутки эксперимента переходили на использование фенантрена.

В первую неделю опыта все исследуемые бактерии окисляли в среднем около 40% УВ модельной смеси. Однако, в период с 7 по 14 сут потребление УВ практически не происходило. Резкое увеличение скорости утилизации УВ было отмечено к 28 сут. Динамика численности микробных клеток в ходе эксперимента была сопоставима со степенью утилизации УВ среды. Так на 7 сут эксперимента численность клеток всех штаммов увеличилась с 10^3 до 10^4 кл/мл и не менялась до 28 сут, когда численность во всех пробах возросла до 10^5 кл/мл.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таксономическая характеристика УВОБ из донных осадков Японского моря. *Sphingomonas* sp. AP_231 (MW784855) – грамтрицательные аэробные палочки, относящиеся к классу Alphaproteobacteria. Согласно литературным данным, представители рода *Sphingomonas*, выделенные из загрязненных вод и почв, часто демонстрируют способность к деградации различных ПАУ, в частности, нафталина, фенантрена, антрацена, флуорена, пирена, бенз(а)пирена и др. [38].

Rhodococcus erythropolis AP_291 (MW784848) и *Rhodococcus* sp. AP_244 (MW784849) – грамположительные аэробные палочки, относящиеся к филуму Actinobacteria. Известно, что родококки – типичные почвенные микроорганизмы, которые довольно часто встречаются и в других экологических нишах различных климатических зон. В литературе имеется большое количество сведений о возможности их использования для биоремедиации, поскольку они способны утилизировать линейные и циклические алканы, а также широкий спектр ПАУ [27]. Кроме того, получены данные о психротрофных УВО штаммах вида *Rhodococcus erythropolis* [17, 37].

Штамм *Pseudomonas* sp. AP_27 (MW784854) – грамтрицательные аэробные палочки, относящиеся к классу Gammaproteobacteria. Бактерии рода *Pseudomonas*, будучи убиквистами, характерны для различных экосистем и обладают широким спектром ферментативной активности, включая способность к окислению нефтяных УВ. Ранее уже сообщалось об участии бактерий этого рода, выделенных из воды Охотского [14] и Японского морей [15], в разложении УВ.

Штамм *Alcanivorax* sp. AP_54 (MW784853) – грамтрицательные аэробные палочки, относя-

Таблица 2. Степень утилизации УВ (%) при температуре 22°C по отношению к исходным концентрациям УВ в модельной смеси

Углеводород	<i>Rhodococcus erythropolis</i> AP_291			<i>Rhodococcus</i> sp. AP_244			<i>Alcanivorax</i> sp. AP_54			<i>Pseudomonas</i> sp. AP_27			<i>Sphingomonas</i> sp. AP_231		
	7 сут	14 сут	28 сут	7 сут	14 сут	28 сут	7 сут	14 сут	28 сут	7 сут	14 сут	28 сут	7 сут	14 сут	28 сут
Нонан (C9)	48 ± 3	54 ± 2	76 ± 3	57 ± 2	61 ± 2	83 ± 3	56 ± 1	54 ± 3	77 ± 2	65 ± 0	62 ± 4	68 ± 3	59 ± 3	58 ± 3	71 ± 2
Декан (C10)	48 ± 2	47 ± 2	67 ± 3	60 ± 2	59 ± 2	65 ± 2	56 ± 1	48 ± 5	64 ± 3	55 ± 2	58 ± 3	56 ± 3	57 ± 1	52 ± 5	60 ± 4
Ундекан (C11)	36 ± 2	37 ± 2	62 ± 3	49 ± 2	45 ± 3	66 ± 3	44 ± 3	46 ± 1	62 ± 3	57 ± 2	59 ± 2	56 ± 4	47 ± 2	45 ± 4	59 ± 2
Додекан (C12)	28 ± 1	28 ± 2	54 ± 4	43 ± 3	46 ± 2	58 ± 4	37 ± 2	39 ± 2	54 ± 3	48 ± 2	52 ± 2	47 ± 5	40 ± 2	38 ± 4	52 ± 4
Тридекан (C13)	27 ± 2	21 ± 5	48 ± 3	33 ± 0	33 ± 0	55 ± 2	28 ± 2	26 ± 4	49 ± 2	40 ± 2	41 ± 2	45 ± 2	32 ± 2	35 ± 2	50 ± 3
Тетрадекан (C14)	25 ± 2	26 ± 1	43 ± 1	25 ± 2	30 ± 3	53 ± 2	22 ± 0	25 ± 3	47 ± 2	35 ± 2	37 ± 4	40 ± 2	26 ± 1	34 ± 1	46 ± 0
Пентадекан (C15)	19 ± 2	17 ± 3	39 ± 2	16 ± 1	26 ± 3	49 ± 2	15 ± 1	21 ± 2	44 ± 2	28 ± 2	23 ± 5	36 ± 2	18 ± 2	31 ± 1	43 ± 1
Гексадекан (C16)	22 ± 0	22 ± 2	38 ± 2	17 ± 1	19 ± 2	49 ± 2	19 ± 2	25 ± 1	45 ± 2	28 ± 2	23 ± 2	26 ± 3	18 ± 1	34 ± 0	44 ± 2
Гептадекан (C17)	19 ± 1	22 ± 2	38 ± 2	17 ± 2	21 ± 2	48 ± 2	23 ± 1	24 ± 2	47 ± 3	20 ± 2	22 ± 3	42 ± 4	18 ± 3	32 ± 4	44 ± 4
Пристан	8 ± 3	12 ± 2	36 ± 2	12 ± 4	19 ± 2	42 ± 2	22 ± 4	26 ± 3	39 ± 3	23 ± 4	24 ± 4	23 ± 3	18 ± 4	23 ± 3	41 ± 5
Октадекан (C18)	15 ± 2	10 ± 4	30 ± 2	15 ± 3	19 ± 4	46 ± 2	18 ± 2	17 ± 2	42 ± 3	19 ± 3	24 ± 1	30 ± 2	23 ± 5	25 ± 2	39 ± 2
Фитан	14 ± 2	19 ± 3	33 ± 2	18 ± 2	23 ± 2	43 ± 1	26 ± 2	28 ± 2	46 ± 3	20 ± 3	26 ± 1	28 ± 2	19 ± 2	27 ± 1	42 ± 3
Нонадекан (C19)	17 ± 2	14 ± 4	34 ± 2	22 ± 2	18 ± 2	46 ± 2	22 ± 3	27 ± 2	43 ± 2	19 ± 1	23 ± 0	28 ± 0	28 ± 0	28 ± 2	40 ± 2
Эйкозан (C20)	15 ± 2	23 ± 3	38 ± 2	31 ± 2	31 ± 2	49 ± 3	28 ± 2	31 ± 4	48 ± 2	24 ± 2	27 ± 2	33 ± 1	36 ± 1	29 ± 5	42 ± 2
Генэйкозан (C21)	25 ± 2	32 ± 2	46 ± 1	39 ± 2	34 ± 3	55 ± 2	40 ± 1	41 ± 1	54 ± 0	32 ± 1	28 ± 5	39 ± 2	49 ± 2	49 ± 1	49 ± 3
Докозан (C22)	34 ± 2	43 ± 1	51 ± 2	48 ± 3	50 ± 3	60 ± 1	47 ± 3	48 ± 4	59 ± 2	39 ± 2	38 ± 3	44 ± 2	56 ± 0	56 ± 0	56 ± 2
Трикозан (C23)	39 ± 2	46 ± 2	51 ± 3	52 ± 2	45 ± 1	64 ± 3	50 ± 2	53 ± 3	61 ± 1	42 ± 3	43 ± 2	49 ± 0	50 ± 2	48 ± 4	54 ± 2
Тетракозан (C24)	45 ± 2	55 ± 2	63 ± 3	58 ± 3	61 ± 2	71 ± 2	61 ± 4	58 ± 5	68 ± 1	46 ± 2	55 ± 2	61 ± 0	52 ± 3	52 ± 2	65 ± 2
Пентакозан (C25)	52 ± 1	53 ± 1	54 ± 2	57 ± 2	58 ± 2	71 ± 1	57 ± 1	52 ± 2	67 ± 2	47 ± 1	47 ± 2	68 ± 2	60 ± 2	59 ± 2	63 ± 2
Гексакозан (C26)	50 ± 2	55 ± 3	54 ± 2	61 ± 0	61 ± 0	70 ± 2	60 ± 1	55 ± 1	65 ± 2	48 ± 1	52 ± 2	65 ± 3	61 ± 4	62 ± 2	62 ± 2
Гептакозан (C27)	46 ± 2	43 ± 4	49 ± 1	49 ± 1	58 ± 1	65 ± 1	54 ± 2	56 ± 3	63 ± 1	41 ± 3	37 ± 4	66 ± 2	55 ± 1	55 ± 0	62 ± 1
Нафталин	50 ± 1	69 ± 2	89 ± 3	66 ± 2	65 ± 4	83 ± 2	74 ± 2	70 ± 4	85 ± 2	76 ± 2	73 ± 5	84 ± 2	75 ± 1	71 ± 4	83 ± 2
Антрацен	45 ± 0	46 ± 1	59 ± 1	45 ± 2	57 ± 1	76 ± 1	40 ± 2	47 ± 3	62 ± 2	49 ± 2	53 ± 0	60 ± 2	41 ± 1	47 ± 2	69 ± 1
Фенантрен	18 ± 6	4 ± 1	52 ± 2	15 ± 2	29 ± 2	72 ± 3	25 ± 1	29 ± 2	67 ± 2	32 ± 2	31 ± 3	56 ± 2	26 ± 3	40 ± 4	62 ± 1

щиеся к классу Gammaproteobacteria. *Alcanivorax* — характерные для морских биоценозов микроорганизмы, представители которых часто обладают способностью к разложению УВ и синтезу сурфактантов. Есть многочисленные сведения об УВО активности этих бактерий в различных морях, включая Японское море [21, 25, 35, 41].

Оценка способности бактериальных штаммов к окислению углеводородов нефти. Из литературы известно, что относительно немного видов бактерий способны расти на средах с *n*-алканами, содержащими до 8 атомов углерода. Использование же в качестве субстрата УВ с 9–18 атомами углерода распространено среди микроорганизмов довольно широко. Алифатические УВ под действием ферментов окисляются по концевой метильной группе до соответствующих спиртов, которые в дальнейшем окисляются до жирных кислот НАД-зависимыми дегидрогеназами [3].

Многие бактерии способны расти на широком спектре *n*-алканов, поэтому могут содержать несколько вариантов ферментных систем алкангидроксилаз [42]. Есть сведения, что гены деградации *n*-алканов экспрессируются избирательно в зависимости от состава УВ, стадии роста культуры бактерий и условий инкубации [11, 34, 43]. Так, например, добавление в среду дрожжевого экстракта стимулировало рост и ускоряло окисление линейных и разветвленных алканов у психротрофного штамма *Rhodococcus* sp. Q15 на среде с дизелем при температуре 5°C [45]. Авторами высказано предположение, что содержащиеся в дрожжевом экстракте факторы роста и витамины способствовали более быстрому наращиванию бактериальной биомассы, что приводило к ускорению процесса деградации УВ.

В одной из работ было показано, что консорциум УВОМ, выделенный из образцов смеси морского льда и морской воды о. Шпицберген, способен полностью разрушать *n*-алканы (C8–C34) и изопреноиды (пристан и фитан) в течение 28 дней инкубации при температуре 4°C [18]. При этом в первую очередь микроорганизмы деградировали короткоцепочечные алканы (C8–C14), утилизация которых происходила в течение первых двух недель культивирования. По истечении этого времени УВОМ переходили к окислению длинноцепочечных УВ (C15–C34), включая пристан и фитан. Молекулярно-генетический анализ позволил определить выявить в составе консорциума бактерий 6 родов: *Marinobacter*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Shewanella* и *Agreia* [18].

Бактерии из донных осадков залива Петра Великого также окисляли большую часть УВ модельной смеси за 28 сут эксперимента, однако, при этом они проявляли несколько иную субстратную специфичность. В первую неделю ис-

следований микроорганизмы предпочитали разлагать коротко- (C9–C13) и длинноцепочечные (C21–27) алканы. И только ко второй неделе опыта отмечалась активная деструкция среднецепочечных УВ (C14–C20), включая пристан и фитан. Это может быть связано с тем, что за разложение алканов в зависимости от длины их углеродной цепи отвечают разные алкан-гидроксилазы, которые могут синтезироваться с неодинаковой скоростью [43].

У всех бактерий исследуемого нами района, несмотря на их разную таксономическую принадлежность, окисление алканов с разной длиной углеродной цепи происходило по одинаковым сценариям. Вероятно, соответствующие гены катаболизма УВ передаются от одних микроорганизмов другим путем горизонтального переноса за счет конъюгации. Плазмидная локализация генов, ответственных за окисление УВ, обеспечивает их распространение как внутри собственной популяции, так и среди представителей других видов бактерий, повышая тем самым метаболический потенциал микроорганизмов в изменяющихся условиях окружающей среды. Возможно, благодаря этому, в отдельных морских акваториях могут формироваться микробные сообщества с определенными катаболическими свойствами.

Интересной особенностью полученных нами штаммов бактерий стала их способность интенсивно окислять одновременно *n*-алканы и ПАУ с первых дней эксперимента. Исходя из химической структуры, биодоступность углеводородов для микроорганизмов уменьшается в следующем порядке: *n*-алканы > разветвленные алканы > низкомолекулярные ароматические соединения > циклоалканы > ПАУ [44]. Ароматические УВ для многих микроорганизмов являются менее предпочтительными субстратами, чем алифатические УВ, поскольку их утилизация требует более сложных ферментативных реакций [3]. Поэтому, как правило, в первую очередь разложению подвергаются линейные УВ, а затем все остальные. В современной научной литературе встречаются единичные работы, в которых была бы доказана способность бактерий окислять одновременно *n*-алканы и ПАУ. Подобные явления ко-метаболизма, когда параллельно идет разложение УВ разных классов, были показаны, например, на штаммах *Rhodococcus* sp. 1B [13] и *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 [27].

Все полученные нами штаммы относятся к бактериям, которые, согласно литературным данным, часто обладают способностью к окислению различных ПАУ [20]. Причем гены деградации ПАУ грамположительных и грамотрицательных бактерий могут отличаться по своей структурной организации. Так, например, в отличие от *Pseudomonas* и других грамотрицательных бактерий, чьи

гены деградации нафталина (*nah*) кластеризованы в один оперон, у грамположительных *Rhodococcus* обычно встречаются три отдельных структурных гена разложения нафталина (*narAa*, *narAb* и *narB*) [28, 31]. Кроме того, транскрипция генов разложения нафталина у родококков индуцируется присутствием в среде нафталина, а *nah*-гены псевдомонад транскрибируются в ответ на накопление салицилатов [28, 31].

Большинство ароматических соединений превращается бактериями в протокатеховую кислоту или катехол, которые в дальнейшем разлагаются путем *орто*- или *мета*-расщепления [3]. В отличие от *nar* и *nah*, гены, кодирующие синтез ключевого фермента *мета*-расщепления катехола (катехол-2,3-диоксигеназы), у грамотрицательных и грамположительных бактерий нередко высоко гомологичны и легко передаются путем конъюгации [22].

Интенсивное потребление ПАУ полученными нами микроорганизмами может быть связано с их адаптацией к высоким концентрациям ПАУ в составе загрязняющих веществ исследуемого района. Аналогичные результаты были зафиксированы и для бактериальных штаммов, выделенных из прибрежных вод юга о. Сахалин, подверженных значительному влиянию антропогенного загрязнения [14]. В указанной работе бактерии родов *Cobetia*, *Pseudoalteromonas*, *Oceanisphaera*, *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Marinomonas* и *Thalassospira* в первую очередь разлагали соединения ароматического ряда, а затем алифатические УВ.

Исследуемые нами микроорганизмы проявляли схожую субстратную специфичность как при низкой, так и при более высокой температуре инкубации. Вместе с тем, у всех штаммов, кроме *Sphingomonas* sp. AP_231, окисление УВ в холодильной камере происходило более интенсивно, чем при 22°C. *Sphingomonas* sp. AP_231 расщеплял УВ модельной смеси с одинаковой эффективностью, независимо от выбранной температуры. Полученные результаты могут быть связаны с постоянно действующими низкими температурами в местах обитания исследуемых штаммов и появлением соответствующей адаптации к ним у микроорганизмов. Вероятно, оптимум работы УВО ферментов указанных бактерий лежит в области низких температур, и изменение условий инкубации приводит к снижению энзиматической активности. Также не исключено, что данные микроорганизмы способны продуцировать изоферменты, отвечающие за разложение одних и тех же УВ при разных температурах. Переход от синтеза одного типа ферментов к другому может занимать продолжительное время. Возможно, по этой причине при 22°C с 7 по 14 сут эксперимента не происходило потребления УВ и увеличения микробной численности.

Динамика численности микробных клеток в ходе экспериментов при обеих температурах была сопоставима со степенью утилизации УВ среды. Однако, несмотря на интенсивное окисление УВ, численность клеток всех штаммов к концу экспоненциальной фазы увеличивалась не более, чем на два порядка по сравнению с исходными значениями. Это может быть связано, как с действием внутривидовой конкуренции за источник углерода в ограниченных условиях, так и с дефицитом азота. Известно, что при недостатке азота многие микроорганизмы запасают углерод в виде внутриклеточных включений. Например, штаммы бактерий рода *Alcanivorax* накапливают триацилглицерины и восковые эфиры при избытке в среде *n*-алканов [24]. *Pseudomonas putida* GPO1 может образовывать внутриклеточные включения поли- β -гидроксиоктаноата при росте на *n*-октане [19], тогда как *Acinetobacter* sp. M-1 образует восковые эфиры на среде с гексадеканом [23].

Таким образом, в ходе проведенных исследований из Японского моря нами впервые получена коллекция психротрофных УВОБ, способных к эффективному окислению широкого спектра УВ. Для точного понимания механизмов деградации бактериями УВ в разных условиях, несомненно, требуется проведение дополнительных исследований свойств УВО ферментов и генов, ответственных за их синтез. Данные штаммы бактерий в дальнейшем могут быть использованы для создания биопрепаратов для очистки морских акваторий дальневосточного региона от аварийных разливов нефти и нефтепродуктов.

Источник финансирования. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-00028).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Алекперова А.И.* О роли нефтеокисляющих бактерий в самоочищении загрязненного нефтью Самур-Апшеронского шельфа Каспийского моря // Вестник МГОУ. 2009. № 2. С. 6–9.
2. *Гайко Л.А.* Многолетняя изменчивость температуры воды и воздуха у российского побережья Японского моря по данным гидрометеорологических станций. В кн.: Океанологические основы исследования дальневосточных морей и северо-западной части Тихого океана / гл. ред. В.А. Акулиничев. Владивосток: Дальнаука, 2013. с. 64–78.
3. *Готтшалк Г.* Метаболизм бактерий. М.: Мир, 1982. 310 с.
4. Доклад об экологической ситуации в Приморском крае в 2017 году // Приморская газета. 2018. № 75 (1569).
5. *Зуенко Ю.И.* Сезонная и межгодовая изменчивость температуры воды в северо-западной части Японского моря // Известия ТИНРО. 2002. Т. 131. С. 3–21.
6. *Израэль Ю.А., Цыбань А.В.* Антропогенная экология океана. Л.: Гидрометеиздат, 1989. 528 с.

7. Коронелли Т.В., Дермичева С.Г., Ильинский В.В. Видовая структура углеводородоокисляющих бактериоценозов водных экосистем разных климатических зон // Микробиология. 1994. Т. 63. № 5. С. 917–923.
8. Коронелли Т.В., Ильинский В.В., Янушка В.А., Красникова Т.И. Углеводородоокисляющая микрофлора акваторий Балтийского моря и Куршского залива, загрязненных при разливе мазута // Микробиология. 1987. Т. 56. № 3. С. 472–478.
9. Патент РФ № 2520084. 2014. Бузолева Л.С. Способ учета нефтеокисляющих бактерий в морской воде.
10. ПНД Ф 12.1:2.2:2.3:3.2–03 “Методические рекомендации. Отбор проб почв, грунтов, донных отложений, илов, осадков сточных вод, шламов промышленных сточных вод, отходов производства и потребления”. М.: Министерство природных ресурсов РФ, 2003. 76 с.
11. Турова Т.П., Кузнецов Б.Б., Новикова Е.В. и др. Гетерогенность нуклеотидных последовательностей генов 16S рибосомной РНК типового штамма *Desulfotomaculum kuznetsovii* // Микробиология. 2001. Т. 70. № 6. С. 788–795.
12. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucl. Acids Res. 1997. V. 5. P. 3389–3402.
13. Andreoni V., Bernasconi S., Colombo M. et al. Detection of genes for alkane and naphthalene catabolism in *Rhodococcus* sp. strain 1BN // Environ. Microbiol. 2000. V. 2 (5). P. 572–577.
14. Buzoleva L.S., Bogatyrenko E.A., Repina M.A., Belkova N.L. Oil-oxidizing activity of bacteria isolated from south Sakhalin coastal waters // Microbiology. 2017. V. 86. № 3. P. 338–345.
15. Chaerun S.K., Tazaki K., Asada R., Kogure K. Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria // Environ. Int. 2004. V. 30. № 7. P. 911–922.
16. Das N., Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview // Biotechnol. Res. Int. 2011. Art. ID 941810. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>
17. Deegan Y., Valentovich L., Petrikov K. et al. Complete genome sequence of *Rhodococcus erythropolis* X5, a psychrotrophic hydrocarbon-degrading biosurfactant-producing bacterium // Microbiol. Resour. Announc. 2019. V. 8. № 48. Art. ID e01234-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.01234-19>
18. Deppe U., Richnow H.-H., Michaelis W., Antranikian G. Degradation of crude oil by an Arctic microbial consortium // Extremophiles. 2005. V. 9. P. 461–470.
19. de Smet M.J., Eggink G., Witholt B. et al. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane // J. Bacteriol. 1983. V. 154. P. 870–878.
20. Ghosal D., Ghosh S., Dutta T.K., Ahn Y. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review // Front. Microbiol. 2016. V. 7. 1369. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01369>
21. Hara A., Syutsubo K., Harayama S. *Alcanivorax* which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation // Environ. Microbiol. 2003. V. 5. № 9. P. 746–753.
22. Hupert-Kocurek K., Guzik U., Wojcieszynska D. Characterization of catechol 2,3-dioxygenase from *Planococcus* sp. strain S5 induced by high phenol concentration // Acta Biochim. Pol. 2012. V. 59(3). P. 345–351.
23. Ishige T., Tani A., Takabe K. et al. Wax ester production from n-alkanes by *Acinetobacter* sp. strain M-1: ultrastructure of cellular inclusions and role of acyl coenzyme A reductase // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. P. 1192–1195.
24. Kalscheuer R., Stoveken T., Malkus U. et al. Analysis of storage lipid accumulation in *Alcanivorax borkumensis*: evidence for alternative triacylglycerol biosynthesis routes in bacteria // J. Bacteriol. 2007. V. 189. P. 918–928.
25. Kasai Y., Kishira H., Syutsubo K., Harayama S. Molecular detection of marine bacterial populations on beaches contaminated by the Nakhodka tanker oil-spill accident // Environ. Microbiol. 2001. V. 3. № 4. P. 246–255.
26. Kim D., Choi K.Y., Yoo M. et al. Biotechnological potential of *Rhodococcus* biodegradative pathways // J. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 28. № 7. P. 1037–1051.
27. Kim S.J., Kweon O., Sutherland J.B. et al. Dynamic response of *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 to BP Deepwater Horizon crude oil // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. P. 4263–4276.
28. Kulakov L.A., Chen S., Allen C.C., Larkin M.J. Web-type evolution of rhodococcus gene clusters associated with utilization of naphthalene // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 1754–1764.
29. Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549.
30. Lane D.J., Pace B., Olsen G.J. et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses // P. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 20. P. 6955–6959.
31. Larkin M. J., Kulakov L.A., Allen C.C. Biodegradation and *Rhodococcus*—masters of catabolic versatility // Curr. Opin. Biotechnol. 2005. V. 16. P. 282–290.
32. Lo Giudice A., Bruni V., De Domenico M., Michaud L. Psychrophiles – cold adapted hydrocarbon – degrading microorganisms. In: Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. [Ed. by Timmis K.N.]. Springer, Berlin, 2010. P. 1897–1921.
33. Margesin R., Neuner G., Storey K.B. Cold-loving microbes, plants, and animals – fundamental and applied aspects // Naturwissenschaften. 2007. V. 94. P. 77–99.
34. Marin M.M., Smits T.H.M., van Beilen J.B., Rojo F. The alkane hydroxylase gene of *Burkholderia cepacia* RR10 is under catabolite repression control // J. Bacteriol. 2001. V. 183. P. 4202–4209.
35. Maruyama A., Ishiwata H., Kitamura K. et al. Dynamics of microbial populations and strong selection for *Cycloclasticus pugetii* following the Nakhodka oil spill // Microb. Ecol. 2003. V. 46. № 4. P. 442–453.

36. Naeem U., Qazi M.A. Leading edges in bioremediation technologies for removal of petroleum hydrocarbons // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2020. V. 27. № 22. P. 27370–27382.
37. Novikov A.D., Lavrov K.V., Kasianov A.S. et al. Draft genome sequence of *Rhodococcus erythropolis* HX7, a psychrotolerant soil-derived oil degrader // Microbiol. Resour. Announc. 2021. V. 10. № 3. Art. ID e01353-20. <https://doi.org/10.1128/MRA.01353-20>
38. Pinyakong O., Habe H., Omori T. The unique aromatic catabolic genes in sphingomonads degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) // J. Gen. Appl. Microbiol. 2003. V. 49. № 1. P. 1–19.
39. Porter K.G., Feig Y.S. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora // Limnol. Oceanogr. 1980. V. 25. № 5. P. 943–948.
40. Swannell R.P., Lee K., McDonagh M. Field evaluations of marine oil spill bioremediation // Microbiol. Rev. 1996. V. 60. № 2. P. 342–365.
41. Tanaka D., Tanaka S., Yamashiro Y., Nakamura S. Distribution of oil-degrading bacteria in coastal seawater, Toyama Bay, Japan // Environ. Toxicol. 2008. V. 23. P. 563–569.
42. van Beilen J.B., Li Z., Duetz W.A., Smits T.H.M., Witholt B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment // Oil Gas Sci. Technol. 2003. V. 58. № 4. P. 427–440.
43. van Beilen J.B., Funhoff E.G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 74. № 1. P. 13–21.
44. van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P. Recent advances in petroleum microbiology // Microbiol. Mol. Rev. 2003. V. 67. P. 503–549.
45. Whyte L.G., Hawari J., Zhou E. et al. Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 7. P. 2578–2584.
46. Xue J., Yu Y., Bai Y. et al. Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: a review // Curr. Microbiol. 2015. V. 71. № 2. P. 220–228.

Psychrotrophic Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria Isolated from the Bottom Sediments of Peter the Great Bay, Sea of Japan

E. A. Bogatyrenko^{a, #}, A. V. Kim^{a, b}, N. S. Polonik^d, T. I. Dunkai^{a, c}, A. L. Ponomareva^d, D. V. Dashkov^a

^aFar Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

^bFederal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

^cZhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

^dIlichev Pacific Oceanological Institute, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

[#]e-mail: bogatyrenko.ea@dvfu.ru

Five strains of psychrotrophic hydrocarbon-oxidizing bacteria were isolated from the bottom sediments of the Peter the Great Bay of the Sea of Japan and classified as the following species: *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus* sp., *Sphingomonas* sp., *Pseudomonas* sp. and *Alcanivorax* sp. All the bacteria under study showed a high oxidizing ability in relation to the decomposition of *n*-alkanes (C9–C27), phytane, pristane and polycyclic aromatic hydrocarbons at 5°C and 22°C. At the same time at 5°C the degradation of hydrocarbons was more intense. Despite the different taxonomic affiliation of the obtained microorganisms all strains primarily utilized short- (C9–C13) and long-chain (C21–27) alkanes, as well as polycyclic aromatic hydrocarbons. The greatest hydrocarbon-oxidizing effect was demonstrated by the *Rhodococcus erythropolis* AP_291 strain, which utilized more than 50% of all hydrocarbons in the model mixture at 5°C during the first week of the experiment.

Keywords: psychrotrophs, hydrocarbon-oxidizing bacteria, oil, hydrocarbons, Sea of Japan, alkanes, polycyclic hydrocarbons