

## ОЦЕНКА МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ОЗЕР ЮГА ЗАПАДНОЙ СИБИРИ ПО ОТНОШЕНИЮ К НЕФТЕПРОДУКТАМ (НА ПРИМЕРЕ МИНЕРАЛЬНОГО МАСЛА)

Астанин А. И.<sup>1</sup>, Алексеев А. Ю.<sup>1</sup>, Адаменко Л. С.<sup>1</sup>, Наумова Н. Б.<sup>2</sup>, Загребельный С. Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский государственный университет, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова 2, [astanin.anton@gmail.com](mailto:astanin.anton@gmail.com)

<sup>2</sup>Институт почвоведения и агрохимии СО РАН, 630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева 8/2, [nnaumova@mail.ru](mailto:nnaumova@mail.ru)

Загрязнение окружающей среды нефтепродуктами приобрело глобальный размах. В последнее время наблюдается все большее загрязнение окружающей среды углеводородами минерального масла, которые не являются ксенобиотиками или токсичными веществами, но их масштабное и разнообразное применение приводит к экологическим проблемам. Из сапропеля, отобранного в пресноводном озере на юге Новосибирской области, с помощью метода накопительного культивирования был выделен штамм микроорганизмов, способный активно метаболизировать в аэробных условиях смесь длинноцепочечных алканов минерального масла в водной среде. Выделенный штамм является перспективным для биоремедиации загрязненных нефтепродуктами водных экосистем. В целом богатые органикой донные отложения озер Западной Сибири представляют собой очень интересный, но малоизученный источник микроорганизмов с разнообразными метаболическими свойствами и, как следствие последних, разнообразным экотехнологическим и биоремедиационным потенциалом.

Ключевые слова: сапропель, углеводородокисляющие микроорганизмы, минеральное масло.

## ESTIMATING METABOLIC ACTIVITY OF LAKE SEDIMENTS FROM THE SOUTH OF WEST SIBERIA IN RELATION TO PETROLEUM PRODUCTS USING MINERAL OIL

Astanin A. I.<sup>1</sup>, Alekseev A. Y.<sup>1</sup>, Adamenko L. S.<sup>1</sup>, Naumova N. B.<sup>2</sup>, Zagrebelny S. N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Novosibirsk state University, Pirogova 2, Novosibirsk 630090 Russia, [astanin.anton@gmail.com](mailto:astanin.anton@gmail.com)

<sup>2</sup>Institute of Soil Science and Agrochemistry, Lavrentieva 8/2, 630090, Russia, [nnaumova@mail.ru](mailto:nnaumova@mail.ru)

Petroleum contamination of the environment has become quite global over the past decades. Recently contamination with mineral oil hydrocarbons has become increasingly pronounced. These petroleum hydrocarbons, being not xenobiotic or toxic substances, nevertheless present serious environmental threat due to their increasingly diverse and massive use. To find and isolate microbes capable of metabolizing petroleum hydrocarbons we sampled lake sediments (sapropel) from the freshwater lake ecosystem in the south of West Siberia (Russia). By means of laboratory culturing in liquid medium enriched with mineral oil as a sole carbon source for microbial utilization we isolated from this sapropel a microbial consortium efficiently metabolizing mineral oil. This consortium may be used for bioremediation of water ecosystems, contaminated with petroleum products.

Keywords: sapropel, hydrocarbons-degrading microorganisms, mineral oil.

Россия является мировым лидером по запасам богатых органическим веществом донных отложений (сапропелей). Например, на юге Западной Сибири находится более 20 тысяч озер разного размера, водного режима, солености и т.п., и около 3 тысяч из них – на территории Новосибирской области. Однако изученность озерного сапропелевого фонда в целом по России и по Западной Сибири, в частности, недостаточна и находится на уровне всего 2 % [1]. Еще меньше известно о влиянии возрастающих запасов донных отложений на экологию пресноводных озер [2] и, особенно, их экотехнологическом потенциале.

В последние годы в мире и в России также наблюдается возрастание интереса к использованию донных отложений в различных отраслях экономики как источника разнообразных органических соединений и микроорганизмов. В России этот интерес

подогревается тем фактом, что для ее территории характерен процесс интенсивного образования донных отложений в озерах, который для многих водоемов приобретает прогрессирующий характер.

Загрязнение окружающей среды нефтепродуктами приобрело глобальный размах [3]. Разливы нефти и нефтепродуктов на почвах, находящихся в сельскохозяйственном обороте, могут постепенно вымываться потоками воды, попадать в грунтовые воды и по водоносным горизонтам транспортироваться в озера и накапливаться в донных отложениях, где далее перерабатываются микрофлорой этих отложений. Иногда нефтепродукты непосредственно в силу разных обстоятельств могут попадать в водные экосистемы, и соответственно, их компоненты, в том числе донные отложения.

В последнее время наблюдается все большее загрязнение окружающей среды углеводородами минерального масла [4], которые, строго говоря, не являются ни ксенобиотиками, ни токсичными веществами, но масштабное и разнообразное применение которых приводит к экологическим нарушениям и проблемам [5].

В настоящей работе мы попытались исследовать активность микроорганизмов, выделенных из донных отложений пресноводного озера на юге Западной Сибири, в плане метаболизма нефтепродуктов.

## **МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Донные отложения.** Донные отложения (сапропель) были отобраны из озера Малое Минзелинское в Колыванском районе Новосибирской области в начале апреля 2013 года. Керн донных отложений был взят на глубину от 0 до 70 см цилиндрическим пробоотборником с вакуумным затвором конструкции НПО «Тайфун» (диаметр 82 мм, длина 70 см), герметично упакован и в день отбора доставлен в лабораторию и помещен в холодильник (+4 °С) для хранения до выполнения анализов.

**Накопительные культуры.** Смешанная культура деструкторов алканов минерального масла была получена путем культивирования навески сапропеля с минеральным маслом в жидкой среде.

Для выделения сообщества деструкторов использовалась минеральная среда MBS (Minimal Basal Salts media), содержащая в 1 л: 1,0 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5,0 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5 мг  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  и 1 мл раствора микроэлементов, содержащего в 1 л: 23 мг  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 31 мг  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 36 мг  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10 мг  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 20 мг  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 50 мг  $\text{ZnCl}_2$ , 30 мг  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . В качестве источника углерода использовали минеральное масло марки автол. Культивирование проводили в конических колбах объемом 250 мл с ватными пробками.

В 100 мл стерилизованной среды MBS вносили навеску сапропеля массой 5 г и 5 мл минерального масла. Культивировали в шейкере-инкубаторе при температуре 35 °С и частоте вращения 150 об/мин. Через 5 суток после начала культивации 1 мл получившейся культуральной жидкости переносили в 100 мл стерилизованной среды MBS с такой же концентрацией минерального масла. Всего было проведено два последовательных пересева в двух повторностях.

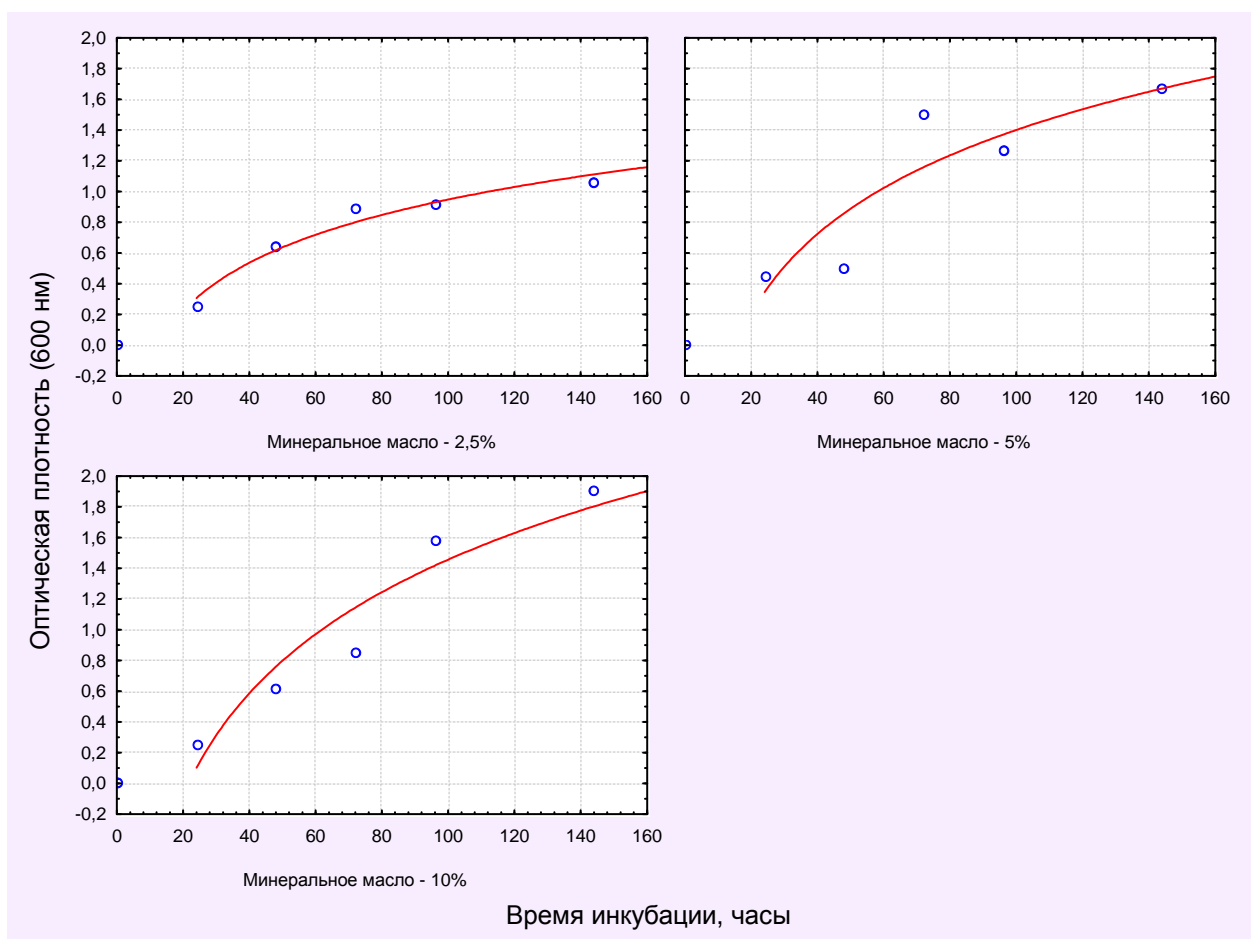
**Изучение кинетики роста накопительной культуры.** Для определения кинетики роста полученной ассоциации деструкторов нефтепродуктов на минеральном масле в 30 мл среды MBS с маслом вносили биомассу накопительной культуры, полученной после двух пересевов до значения оптической плотности  $OD=0,010$  при 600 нм (длина оптического пути 1 см). В процессе культивации каждые 24 ч из культуры отбирали пробу и измеряли значение оптической плотности, параллельно измеряли значение в холостых пробах без клеток и без масла.

Также подсчитывали количество колониеобразующих единиц (КОЕ) путем высева аликвоты (0,5 мл) последовательных разведений жидкой среды на агаризованную (3 % агара) триптон-дрожжевую питательную среду с последующей инкубацией в течение 48 часов при 30 °С.

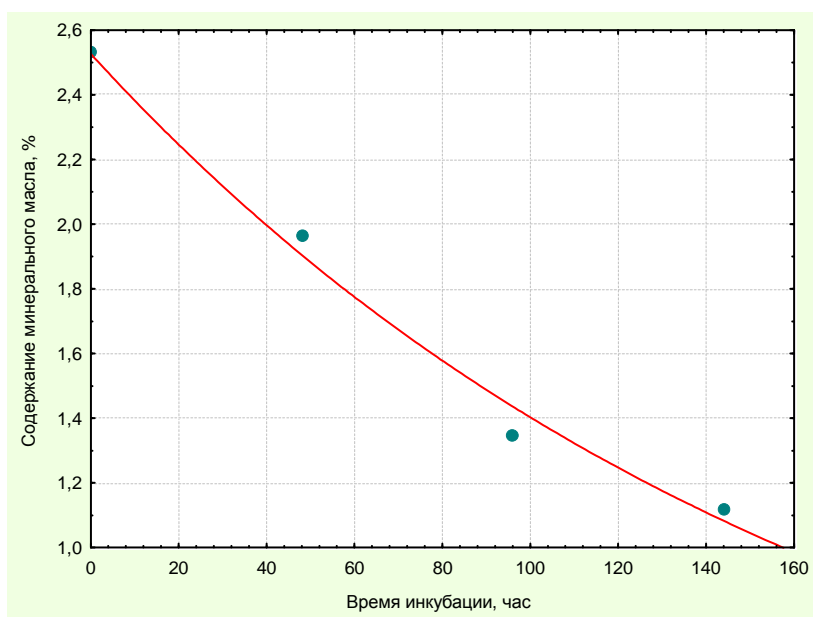
**Изучение кинетики потребления субстратов.** Для определения кинетики деградации внесенного минерального масла в 30 мл среды MBS вносили известную навеску минерального масла в концентрациях 2,5 % и 5 % и биомассу из накопительной культуры до  $OD_{600}=0,01$ . Каждые 48 ч концентрацию нефтепродуктов определяли методом ИК-спектрофотометрии по интенсивности поглощения С-Н связей в инфракрасной области спектра  $2930\text{ см}^{-1}$  в соответствии с методикой [6].

### **Результаты и их обсуждение**

При инкубации накопительной культуры наблюдали активный рост бактерий, судя по оптической плотности при 600 нм (рис.1), при этом, чем больше была исходная концентрация минерального масла в культуральной среде, тем активнее шло нарастание биомассы. Определение концентрации минерального масла в культуральной среде выявило его значительное снижение в ходе инкубации (рис. 2): за 144 часа инкубации до 44 % от внесенного количества при начальной концентрации 2,5 % в инкубационной среде, до 38 % – при внесении в концентрации 5,0 %, соответственно.

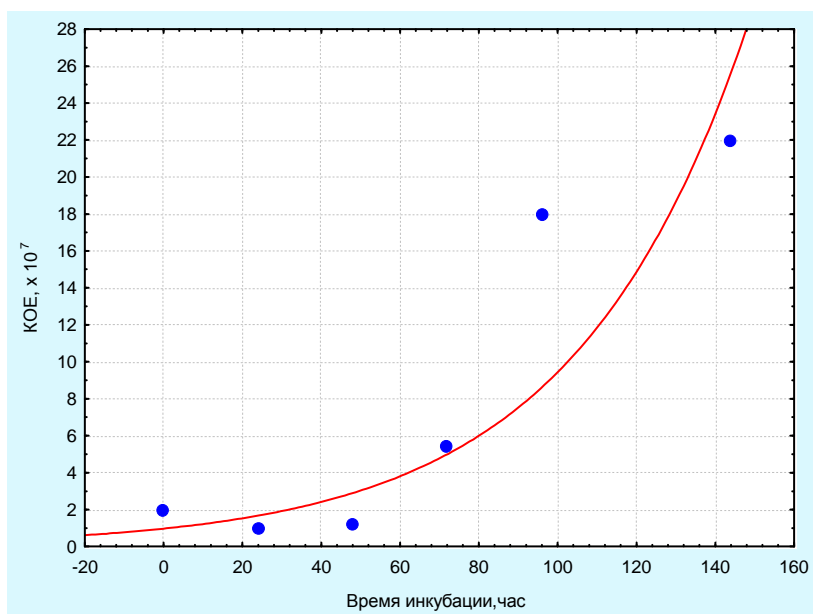


**Рис. 1.** Кинетика роста накопительной культуры, оцениваемая по изменению оптической плотности при 600 нм



**Рис. 2.** Изменение концентрации минерального масла в культуральной среде в ходе инкубации

Количество КОЕ в среде с разной концентрацией минерального масла имело порядок в десятки миллионов в 1 мл, т.е. можно утверждать, что было довольно велико. Изменение содержания КОЕ в среде в ходе инкубации накопительной культуры представлено на рис.3. Отметим, что содержание КОЕ в среде хорошо коррелировало с оптической плотностью при 600 нм: коэффициент корреляции был равен 0,53, 0,73 и 0,95 при 2,5, 5,0 и 10,0 % начальной концентрации минерального масла.



**Рис. 3.** Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) при инкубации с минеральным маслом в исходной концентрации 10,0 %

Фенотип колоний микроорганизмов, растущих на твердой среде для подсчета КОЕ, представлен на рис. 4. Напомним, что не все микроорганизмы, утилизирующие алканы минерального масла в наших накопительных культурах, будут расти на твердой среде. Кроме того, при подсчете КОЕ на твердой среде учитываются в основном быстрорастущие штаммы [7], так что медленно растущие, если таковые имелись в накопительной культуре, могли оказаться неучтенными. В любом случае, однако, наличие одного и того же фенотипа, геном которого мы в ходе дальнейших исследований планируем выделить и полностью секвенировать, позволяет предположить наличие как минимум одного штамма алканокисляющего микроорганизма. Несмотря на то, что эта культура происходит из водной экосистемы, тот факт, что она растет в аэробных условиях на твердой поверхности, говорит о потенциале ее роста и в почвах, загрязненных нефтепродуктами.

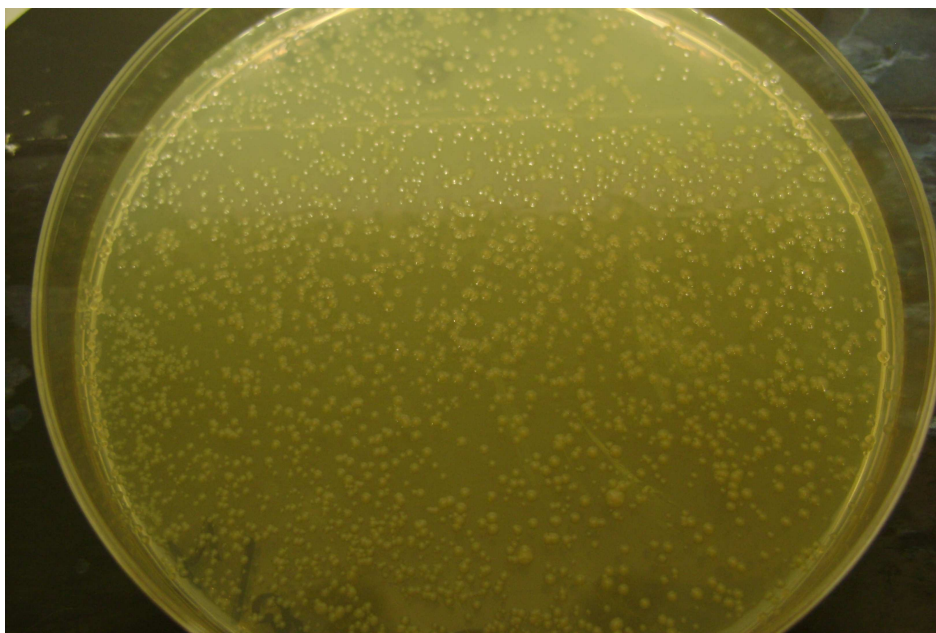


Рис. 4. Колонии микроорганизмов из накопительной культуры, полученной из сапропелей после третьего пересева на селективную среду с минеральным маслом как единственным источником углерода, при высеве на плотную агаризованную среду.

Подчеркнем, что в качестве источника микроорганизмов, окисляющих алканы минерального масла, был использован сапрпель из пресноводного озера, не содержащий нефтепродуктов в момент отбора и вообще не имеющий истории загрязнения нефтепродуктами, помимо количеств, попадающих с косметическими средствами и т.п., т.е. в основном за счет рекреационной активности. При этом в сообществе имеются аборигенные микроорганизмы, способные эффективно метаболизировать углеводороды минерального масла, что свидетельствует об огромном биохимическом потенциале микробных сообществ озерных донных отложений.

### **Заключение**

Выделенная культура микроорганизмов способна активно метаболизировать смесь длинноцепочечных алканов минерального масла в водной среде, и, следовательно, представляет перспективную культуру для биоремедиации загрязненных нефтепродуктами водных экосистем.

Богатые органикой донные отложения озер могут служить источником микроорганизмов с разнообразными метаболическими свойствами и, следовательно, разнообразным экотехнологическим и биоремедиационным потенциалом.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ ГК 14.515.11.0025 и тема №4.3705.2011.*

## Список литературы

1. Курзо Б. В., Гайдукевич О. М., Кляуззе И. В., Зданович П. А. Особенности формирования вещественного состава сапропеля органического типа в озерах различных регионов Беларуси // Природопользование. – 2012. – Вып. 21. – С.183-190.
2. Donohue I., Molinos J. G. Impacts of increased sediment loads on the ecology of lakes // Biol. Rev. – 2009. – V. 84. – P. 517–531.
3. Snape, I., Riddle, M. J., Stark, J. S., Cole, C. M., King, C. K., Duquesne, S., Gore, D. B., 2001. Management and remediation of contaminated sites at Casey Station, Antarctica. Polar Rec. 37, 199e-214.
4. Gallego, J. L., Loredó, J., Llamas, J. F., Vázquez, F. & Sánchez, J. (2001). Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation // Biodegradation 12, 325–335.
5. Popp N., Schlomann M., Mau M. Bacterial diversity in the active stage of a bioremediation system for mineral oil hydrocarbon-contaminated soils // Microbiology (2006), 152, No. 11, 3291–3304.
6. ПНД Ф 14.1.272-2012 Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в сточных водах методом ИК-спектрофотометрии на концентратометре КН-2м.
7. Felske, A., Wolterink, A., van Lis, R., de Vos, W. M. & Akkermans, A. D. L. (1999). Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation. FEMS Microbiol Ecol 30, 137–145.

### Рецензенты:

Тикунова Н.В., д.б.н., заведующая лабораторией молекулярной микробиологии института физико-химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

Азаев М.Ш., д.б.н., заведующий отделом научно-методической подготовки персонала по работе с возбудителями особо опасных вирусных инфекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирский район, р.п. Кольцово.