

На правах рукописи

A handwritten signature in purple ink, reading "А. В. Лихошвай", with a horizontal line underneath it.

ЛИХОШВАЙ Александр Викторович

**Экология бактерий рода *Rhodococcus* из глубоководных битумных построек
озера Байкал**

03.02.08 – экология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск – 2011

Работа выполнена в Отделе микробиологии Учреждения Российской академии наук Лимнологический институт Сибирского отделения РАН, Иркутск.

Научный руководитель:

доктор биологических наук Т.И. Земская

Научный консультант:

доктор химических наук, академик М.А. Грачев

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор **Намсараев Баир Бадмабазарович**

доктор биологических наук, профессор **Саловарова Валентина Петровна**

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН

Защита состоится 27 декабря 2011 г. в 12:00 на заседании совета Д 212.074.07 при ГОУ ВПО Иркутский государственный университет по адресу: 664003 г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, Байкальский музей им. проф. М.М. Кожова (ауд. 219).

Факс (3952) 241855

Email: dekanat@bio.isu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Иркутского государственного университета.

Автореферат разослан 25 ноября 2011 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета, к.б.н.



А.А. Приставка

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Бактерии рода *Rhodococcus*, относящиеся к филуму *Actinobacteria*, семейству *Nocardiaceae*, обитают в почве, соляных шахтах, антарктических льдах, морских осадках, сточных водах и многих других экосистемах (Gorlach et al., 1994; Anan'ina et al., 2011; Lo Giudice et al., 2007; Helmke and Weyland, 1984; Yoon et al., 2000a; Alvarez, 2010). Отдельные представители данного рода способны использовать в качестве единственного источника углерода широкий спектр органических веществ, в том числе углеводороды, опасные с точки зрения экологии, в связи с этим их изучение имеет не только научное, но и прикладное значение (Larkin et al., 2006). Родококки способны окислять высокомолекулярные *n*-алканы и сложные хлорорганические соединения, которые трудно поддаются биодegradации (De Carvalho, 2004; Luis et al., 2006). Представители рода *Rhodococcus* утилизируют бензол, толуол, нафталин (Liu, 2009), гербициды (De Schrijver and De Mot, 1999) и полихлорбифенилы (Vaillancourt et al., 2003). Отдельные штаммы в настоящее время используются при производстве биопрепаратов, применяемых для биоремедиации при нефтяных загрязнениях (Ovchinnikova, 2009; Kuyukina et al., 2010).

В озере Байкал при исследовании поверхностных вод в районе естественных нефтепроявлений у м. Горевой Утёс и близ устья р. Большая Зеленовская культивированием было выявлено микробное сообщество с доминированием бактерий-деструкторов нефти из родов *Pseudomonas*, *Micrococcus* и *Rhodococcus*. В отличие от других бактерий, родококки были найдены не только в нефти на водной поверхности, но и в донных осадках того же района (Павлова и др., 2008a).

Открытие на дне Байкала в районе м. Горевой Утёс битумных построек при погружениях глубоководных обитаемых аппаратов (ГОО) «Мир» в 2008 г., в которых участвовал автор настоящей работы, инициировало исследования по изучению механизмов их образования и деструкции. В частности, представляло интерес исследовать населяющую их микрофлору и оценить наличие микроорганизмов, активно деградирующих нефть.

Цель исследования – изучить микроорганизмы в битумных постройках, расположенных на дне Байкала, и выделить штаммы бактерий, активных деструкторов углеводородов. Были поставлены следующие задачи:

1. Оценить разнообразие микроорганизмов в двух битумных постройках с различной активностью разгрузки нефти.
2. Выделить в культуры из образцов битума активные штаммы микроорганизмов-деструкторов нефти, в лабораторных условиях изучить их способность к использованию *n*-алканов в качестве единственного источника углерода.
3. Установить филогенетическую принадлежность выделенных штаммов, исследовать физиолого-биохимические свойства и морфологию полученных штаммов бактерий рода *Rhodococcus*.

4. Установить наличие алкан-1-монооксигеназ – ферментов, инициирующих биодеструкцию *n*-алканов, и расшифровать структуру *alk*-генов у одного из штаммов *Rhodococcus*.
5. Исследовать способность штаммов рода *Rhodococcus* к синтезу биосурфактантов класса гликолипидов.
6. Провести сравнение структур алкан-1-монооксигеназ одного из штаммов рода *Rhodococcus*, выделенных из битумной постройки, между собой и со структурами этих генов других представителей.

Научная новизна. Впервые исследована филогенетическая структура микробных сообществ в двух битумных постройках на дне Байкала, различающихся по химическому составу и интенсивности разгружающихся через них углеводородов. Установлено, что в битумных постройках обитают представители двух доменов: *Archaea* и *Bacteriae*, включающие микроорганизмы различных таксонов. Установлено, что колонии из неактивной битумной постройки, способные расти на агаре в присутствии нефти в качестве единственного источника углерода, по морфофизиологическим признакам могут быть отнесены к роду *Rhodococcus*. Пять штаммов микроорганизмов в лабораторных экспериментах деградировали широкий спектр *n*-алканов (C₁₂-C₂₉). Впервые в геноме одного из байкальских штаммов полностью расшифрованы гены, кодирующие ферменты, осуществляющие окисление *n*-алканов. Показано, что структуры этих генов гомологичны структурам генов бактерий рода *Rhodococcus*, обнаруженных в морской воде и почве, загрязнённой нефтью.

Практическая значимость работы. Получены и охарактеризованы 5 штаммов рода *Rhodococcus*, изолированных из неактивной битумной постройки на дне (глубина 900 м) озера Байкал. Установлена их способность деградировать нефть и *n*-алканы, что позволяет рекомендовать их как возможные компоненты биопрепаратов, применяемых для биоремедиации холодноводных водоёмов. Показано, что штамм *Rhodococcus erythropolis* №4 выделяет биосурфактанты гликолипидной природы. Полученные данные по структуре *alk*-генов могут быть использованы при разработке структур праймеров необходимых для детекции этих генов у других микроорганизмов.

Работа выполнена в группе по изучению углеводородокисляющих микроорганизмов, отделе микробиологии Учреждения Российской академии наук Лимнологический институт Сибирского отделения РАН.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Битумные постройки, обнаруженные на дне озера Байкал в районе естественного нефтепроявления на глубине 900 м, различаются населяющими их микроорганизмами. Видовой состав микроорганизмов, населяющих активную постройку, из которой выделялась нефть, и неактивную (нефть не выделялась), различный.

2. Из неактивной битумной постройки при культивировании на среде, в которой в качестве единственного источника углерода использовалась нефть, выделены только представители рода *Rhodococcus*. Комплексный анализ 5 выделенных штаммов микробиологическими, молекулярно-биологическими, электронно-микроскопическими и хроматографическим методами показал, что все штаммы относятся к виду *Rhodococcus erythropolis*. Они способны участвовать в деструкции природных углеводов и обладают высокой экологической пластичностью – способностью к росту в широком диапазоне (от +4 до +37 °С) температур и при концентрациях NaCl от 3 и 5%.

Апробация работы и публикации. Результаты работы были представлены на IV-ом съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008), X-ом Съезде Гидробиологического общества при РАН (Владивосток, 2009), V-ой Верещагинской байкальской международной конференции (Иркутск, 2010), 10th International Conference on Gas in Marine Sediments (Листвянка, 2010), 32nd Annual Lorne Genome Conference (Лорн, Австралия, 2011), 3-ем Байкальском микробиологическом симпозиуме с международным участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах» (Иркутск, 2011).

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 95 страницах и включает введение, обзор литературы (Глава 1), экологическую и микробиологическую характеристику района мыса Горевой Утёс (Глава 2), объекты и методы исследования (Глава 3), химическое и микробиологическое исследование битума неактивной постройки (Глава 4), идентификацию генов у выделенных штаммов *Rhodococcus erythropolis*, участвующих в деструкции *n*-алканов (Глава 5), исследование выделенных штаммов *Rhodococcus erythropolis* в лабораторных условиях (Глава 6), заключение, выводы и список литературы из 142 источников, из них 109 – зарубежных. Работа иллюстрирована 1 таблицей и 20 рисунками.

Работа поддержана грантами: РФФИ 09-04-12231-офи_м, 10-05-00681-а, РФ МК-1901.2010.5. Автор выражает благодарность научному руководителю работы д.б.н. Т.И. Земской, научному консультанту д.х.н. академику М.А. Грачёву, к.б.н. О.Н. Павловой, к.х.н. А.Г. Горшкову, д.б.н. Е.В. Лихошвай, Т.А. Ханаевой, к.б.н. Н.Л. Бельковой, Е.В. Сухановой, к.б.н. И.Б. Клименкову, к.б.н. Т.А. Щербаковой, Ю.П. Галачьянцу, (Лимнологический институт СО РАН), к.б.н. И.В. Морозову (центр коллективного пользования «Секвенирование ДНК»), д.б.н. Н.В. Равину (центр коллективного пользования «Биоинженерия» РАН) за консультативную и практическую помощь, Т.В. Кашик (Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Проведен анализ литературы по распространению естественных выходов нефти в водных экосистемах, описано, какие источники углеводородов могут служить для представителей рода *Rhodococcus* в качестве единственного источника углерода, описаны механизмы окисления углеводородов, рассмотрена ферментативная система, обеспечивающая их деградацию микроорганизмами. Описаны история изучения нефтепроявлений на оз. Байкал и приведены данные по биодеструкции углеводородов, дана геохимическая характеристика недавно открытого района естественных нефтепроявлений у м. Горевой Утёс.

Глава 2. Экологическая и микробиологическая характеристика района мыса Горевой Утёс

В ходе совместной экспедиции Лимнологического института СО РАН и Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН с помощью ГОА «Мир» в 2008-09 гг. при обследовании дна в районе нефтепроявления (Средний Байкал) обнаружены битумные образования (постройки). По данным Горшкова с соавторами (2010), в одной из активных построек (№3) содержание *n*-алканов составляет 770 мг/г (77 %), а гомологический ряд представлен C₁₃-C₃₂ с максимумом при C₂₃, C₂₄, при этом характерным является сужение гомологического ряда по сравнению с нефтью, собранной с водной поверхности. Содержание *n*-алканов в неактивной постройке (№8) ниже – 148 мг/г (15 %), а состав *n*-алканов с длиной цепи C₂₂-C₃₄ и максимумом при C₂₅, C₂₆, отмечено наличие «нафтенового горба» – смеси высших углеводородов, неразделяемых газовой хроматографией. В байкальской нефти, собранной с водной поверхности, обнаружены уникальные биомаркеры – сесквитерпаны и гомологический ряд гопанов (Конторович и др., 2007), их наличие указывает на то, что нефть на своём пути из недр осадков (3 км) к их поверхности не претерпевала гидротермального воздействия свыше 200 °С.

С использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) установлено, что микроорганизмы представлены метанооксиляющими и разрушающими высшие углеводороды бактериями. Выявлены представители альфа-, бета- и гаммапротеобактерий, актинобактерии и *Firmicutes*, включающие представителей родов *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* (Ломакина и др., 2009). В водной толще были обнаружены псевдомонады и спорообразующие микроорганизмы, родственные представителям широкого класса бактерий, выделенных из донных осадков Охотского моря, Антарктиды, почв, загрязнённых углеводородами и др. (Ломакина и др., 2009). Район нефтепроявлений у м. Горевой Утёс отличается не только уникальными экологическими условиями, но и особыми свойствами нефти и битума, а также разнообразием местной биоты. Исследователи, которые погружались в данном районе на ГОА «Мир», отмечали особенности биотопа: обилие на битумных постройках амфипод, олигохет, моллюсков, плоских червей турбеллярий

и даже губок (Хлыстов и др. 2009). В неактивной постройке внутри битума обнаружены белые сгустки, напоминающие вату, внутри которых обитали олигохеты рода *Pseudorhynchelmis*, нематоды и единичные особи остракод (Хлыстов и др., 2009). Очевидно, что нефтеокисляющие бактерии могут играть важную роль как первое звено пищевой цепи этих животных.

Глава 3. Объекты и методы исследования

В упомянутой выше экспедиции на ГОА «Мир» были отобраны и доставлены в лабораторию для исследований несколько образцов битумных построек. Они представляли собой вязкую бурую битуминоидную массу зернистой структуры, из которой при поднятии на поверхность проступила вода. При комнатной температуре через некоторое время материал превращался в пластичную гомогенную массу.

Элементный анализ (С, Н, N, S, Cl) битума постройки №8 проведен на анализаторе Flash EA 1112 (Германия) в Иркутском институте химии имени А.Е. Фаворского.

Хроматографический анализ битума построек проводили на масс-спектрометре Agilent GC 6890 MSD 5973 (Германия) с капиллярной колонкой (DB-17ms, l = 30 м, внутренний диаметр 0,32 мм). Сквалан и дейтерированные ПАУ (полиароматических углеводородов – нафталин-d₈, аценафтен-d₁₀, фенантрен-d₁₀, хризен-d₁₂, перилен-d₁₂) использовали в качестве внутренних стандартов при определении *n*-алканов и ПАУ. Навеску битума растворяли в хлористом метиле (2 мг/мл) с добавлением 0,5 мл раствора сквалана в хлороформе (0,3 мг/мл). В колонку вводили 2 мкл экстракта с разделением потока в инжекторе с соотношением 1:10. В качестве газа-носителя использовали гелий, подаваемый в хроматограф со скоростью истечения 1 мл/мин. Температура инжектора составляла 280 °С. Условия хроматографии: первоначально температура колонки составляла 50 °С в течение 5 мин, затем следовал градиент температур (15 °С/мин) от 50 до 310 °С и далее изотермический режим при 310 °С в течение 15 мин. Хроматограммы регистрировали в режиме селективного ионного детектирования по ионам с *m/z*: 57 и 71. Измерения проводили в трёх повторностях. Концентрации *n*-алканов рассчитывали как средние значения для трёх параллельных измерений (погрешность не превышала 10 %).

Выделение штаммов микроорганизмов. Образцы (1 г) битумной постройки смешали с нефтью (100 мкл) из месторождения Югринское (Западная Сибирь), стерилизованной через поликарбонатные ГТТР фильтры с диаметром пор 0,2 мкм (Millipore), и равномерно распределили по поверхности агаризованной среды Раймонда в чашках Петри (Raymond, 1961) (г/л): КН₂РО₄ – 2,0; СаСl₂·2Н₂О – 0,01; МgSO₄·7Н₂О – 0,2; FeSO₄ – 0,01; NH₄NO₃ – 2,0; MnSO₄·5Н₂О – 0,02; Na₂НРО₄ – 3,0; Na₂СО₃ – 0,1; агар – 1,5; рН = 7,2. После инкубирования чашек при комнатной температуре в течение 168 ч на поверхности среды появилось множество одинаковых

мелких колоний, пять из которых было отобрано случайным образом. Они были перенесены в пробирки с питательной агаризованной средой РПА (рыбопептонный агар) для дальнейшего культивирования при комнатной температуре, чистые культуры были получены путём многократного пересева на этой же среде. Колоний на стерильной нефти без добавления битума выявлено не было. Полученные штаммы пронумеровали от 1 до 5 и законсервировали в 1,5 мл пробирках типа «Eppendorf», их хранили при 4 °С до последующих манипуляций. Штаммы также законсервированы в 50 % растворе глицерина и хранятся при -70 °С.

Физиолого-биохимические свойства выделенных штаммов микроорганизмов исследовали на основании морфологических и физиолого-биохимических признаков по определителю бактерий Берджи (Bergey's Manual of determinative bacteriology, 1994).

Чистоту штаммов проверяли под световым микроскопом «Аxiostar Plus» при увеличении 100×10, окраску по Граму проводили по общепринятой методике (Романенко, 1974).

Морфологические свойства одного из штаммов (№2) изучали с использованием сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) Philips SEM 525-М. Ультратонкие срезы (5 нм) были получены на микротоме Leica Ultracut R (Германия) и исследованы с использованием трансмиссионного электронного микроскопа (ТЭМ) LEO 906E. Для СЭМ клетки бактерий фиксировали в 2,5 %-м растворе глутаральдегида, нанесли на столик, высушили и покрыли золотом. Для ТЭМ клетки фиксировали в 2,5 %-м растворе глутаральдегида и контрастировали OsO₄, после чего заливали в эпоксидную смолу (Araldite M 502 Kit SPI, USA). Далее были сделаны ультратонкие срезы образцов, которые закрепляли на специальные сеточки.

Выделение ДНК штаммов микроорганизмов проводили по модифицированной методике ферментативного лизиса с последующей фенол-хлороформной экстракцией (Sambrook, Fritsch, 1989). ПЦР ДНК штаммов проводили в режиме (30 циклов): активация полимеразы – 94 °С, 2 мин; денатурация – 92 °С, 45 сек; отжиг – 52 °С, 45 сек; амплификация – 72 °С, 60 сек; элонгация – 72 °С, 60 сек; финальная элонгация – 72 °С, 2 мин (1 цикл). Использовали праймеры 27f, 1350r, комплементарные наиболее консервативным участкам гена 16S рНК (Brosius et al., 1981; Денисова и др., 1999). Размер и чистоту продуктов ПЦР всех штаммов проверяли электрофорезом в 1,5 %-м агарозном геле. Секвенирование проводили с теми же праймерами, длина нуклеотидных последовательностей – 895-1118 п.о. Сравнительный анализ проводили с использованием международной базы данных NCBI в программе BLASTN и ClustalW v.1.4, построение филогенетических деревьев осуществляли с помощью пакета программ MEGA v.4.0 с использованием алгоритма группирования «neighbor-joining». Статистическую достоверность ветвления оценивали с помощью «bootstrap-анализа» с использованием соответствующей функции той же программы. Наличие химерных структур определяли анализом после-

довательностей с помощью программы PINTAIL (<http://www.cardiff.ac.uk/biosi/research/biosoft>).

Идентификация *alk*-генов штаммов проводили с использованием ПЦР-программы, описанной выше, и с тремя наборами праймеров *alkB-1*, *alkB-2* и *alkB-3* (Sei et al., 2003).

Последовательности зарегистрированы в международной системе NCBI под следующими номерами: 16S рРНК – HQ702468, HQ702469, HQ702470, HQ702471, HQ702472; *alk*-гены – HQ702473, HQ702474, HQ702475, HQ702477.

Метагеномный анализ микробного сообщества битумных построек. Для одного из образцов постройки №8 была выделена суммарная ДНК, как описано выше. Анализ проведён под руководством д.б.н. Н.В. Равина в «Центре Биотехнологии» РАН. ПЦР гена 16S рРНК проводили с праймерами U341F 5'-ССТАСGGGRSGCAGCAG-3', U515R 5'-ТТАСССГССГССКГСТГВССАС-3', по программе (30 циклов): активация полимеразы – 96 °С, 3 мин; денатурация – 96 °С, 30 сек; отжиг – 55 °С, 30 сек; амплификация – 72 °С, 40 сек; элонгация – 72 °С, 10 мин. Секвенировали на GS FLX (Roche) на основе технологии пиросеквенирования «454 Life Science».

Влияние температуры на культивирование штаммов изучали в 50 мл пробирках с 10 мл среды Раймонда и 10 мкл стерильной нефти при 4, 22, 37 и 46 °С в течение 168 ч.

Исследование деградации *n*-алканов выделенными штаммами проводили в трёх повторностях в стеклянных флаконах (200 мл) со средой Раймонда (100 мл), куда помещали культуру и 100 мкл нефти в качестве единственного источника углерода. Флаконы инкубировали в течение 92 ч при 22 °С на орбитальном шейкере BIOSAN OS-10 с постоянным перемешиванием (120 об./мин). Через каждые 24 ч отбирали один флакон (3 повторности, 4 дня – 12 флаконов) для исследования. Весь объём среды экстрагировали хлористым метиленом (3 x 50 мл). Экстракт анализировали хроматографически, как описано ранее (Uchida et al., 1989b).

Выявление гликолипидов проводили у штамма №4, который засеивали в 50 мл среды СПА (сухой питательный агар) в колбу (100 мл) с ватно-марлевой пробкой для предварительного накопления биомассы. Посевной материал получали при комнатной температуре и постоянном перемешивании (100 об./мин) в течение 24 часов. Далее 5 мл полученной биомассы переносили в колбу (5 л) с ватно-марлевой пробкой с ферментативной средой состава (Куюкина, 2007) (г/л): KNO₃ – 0,1; KH₂PO₄ – 2,0; K₂HPO₄ – 2,0; (NH₄)₂SO₄ – 2,0; NaCl – 1,0; MgSO₄·7H₂O – 0,2; CaCl₂·2H₂O – 0,02; FeCl₃·7H₂O – 0,01; раствор микроэлементов (Drews, 1974) – 1,0 мл, содержащей в качестве единственного источника углерода 3 объёмных % *n*-гексадекана. Для повышения выхода биосурфактантов в минеральную среду вносили дрожжевой экстракт (0,1 г/л), а концентрация KNO₃ была снижена в 10 раз (до 0,1 г/л). Культивирование проводили при комнатной температуре и постоянном пе-

ремешивании (80 об./мин) в течение 456 ч. По истечении времени в культуральной среде выделилось три слоя, каждый из которых отбирали в отдельную пробирку.

Клетки отделяли центрифугированием (3600g, 20 мин), отбрасывали слой гексадекана и собирали клетки, находящиеся в интерфазе и осаждённые. Проводили двукратную экстракцию реактивом Фолча (хлороформ : метанол = 2 : 1, 50 % к объёму экстрагируемой смеси) в течение 3 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании (160 об./мин). Объединенный нижний слой, содержащий гликолипиды, упаривали на роторном испарителе до постоянного объема при температуре 40 °С. Для удаления остаточного гексадекана пробу наносили на концентрирующий патрон для твердофазной экстракции Discovery® DSC-Si SPE Tube (500 мг, объем 6 мл, Supelco) и гексадекан элюировали 100 мл гексана, контролируя его наличие в элюате методом ГХ-МС. Фракцию гликолипидов элюировали 10 мл смеси хлороформ : метанол = 5 : 1,5, упаривали досуха на роторном испарителе при 40 °С и перерастворяли в 200 мкл хлороформа (Uchida et al., 1989b). Растворившуюся часть (экстракт) наносили на хроматографическую пластинку и проводили двумерную хроматографию. В первом направлении проводили в системе хлороформ : метанол : вода = 6,5 : 1,5 : 0,2 мл. При хроматографировании во втором направлении вместо воды был взят 0,1% раствор тетрабората натрия. Пластинку высушивали и опрыскивали водой. О наличии гликолипидов судили по проявлявшимся пятнам, расположенным ниже горизонтальной линии.

Полногеномное секвенирование *alk*-генов. У штамма №4 полностью расшифрованы *alk*-гены (Illumina GAIIx, Индия). Число чтений – 10 млн п.о. Сборкой фрагментов отдельных нуклеотидных последовательностей с использованием программы Velvet_1.1.02 получено 3897 контигов среднего размера 1,8 тыс. п.о. и суммарной длиной 6,9 мегабаз. Далее их транслировали в аминокислотные последовательности в программе ExPASy Translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>). Поиск последовательностей алкангидроксилаз проводили с использованием микроорганизма *R. erythropolis* PR4 из международной базы данных NCBI. По аминокислотным последовательностям найдены ближайшие гомологи при помощи программы BLASTX. Структуры проанализировали в программе ClustalW v.1.4. Филогенетический анализ осуществляли с помощью пакета программ MEGA v.4.0 и алгоритма группирования «neighbor-joining».

Глава 4. Химическое и микробиологическое исследование битума неактивной постройки

В момент отбора образцов постройка не была активна. Элементный состав постройки следующий: С – 77,06 %; Н – 12,12 %; N – 6,38 %; S – 0,75 %; Cl – 0,69 %; зольность – 2,86 %. По данным хроматографического анализа в неактивной постройке содержится 148 мг/г C₂₂-C₃₄ *n*-алканов, с максимумом при C₂₅; 0,03 % составляют полиароматические углеводороды (ПАУ), 1 % – изопреноиды, каротиноиды и

гопаны; остальные 48 % приходятся на «нафтено-ароматический горб» – смесь высших углеводородов, неразделяемых газовой хроматографией. Примерно 33 % органического материала не вышло из колонки. Полученные данные были сопоставлены с данными по составу другой, активной, битумной постройки №3 и нефти с водной поверхности, отобранных в том же районе нефтепроявлений у м. Горевой Утёс (Горшков, 2010; Конторович, 2007) (рис. 1). Нефть, собранная с водной поверхности, содержит 900 мг/г (90 %) *n*-алканов, а в битуме постройки №3 – 770 мг/г. Содержание *n*-алканов в исследуемой застройке №8 оказалось в 5 раз меньше (148 мг/г), а гомологи легче C₂₂ отсутствуют. В составе неактивной постройки не обнаружены *n*-алканы короче C₂₂. Более того, общее содержание этих углеводородов гораздо меньше, чем в активной застройке. Разность концентраций *n*-алканов в нефти активной битумной постройки №3 и неактивной №8 связана с процессом депарафинизации (Горшков и др., 2010). На своём пути из глубинных слоёв осадка к поверхности дна нефть претерпевает первичное фракционирование с накоплением высших парафинов. При достижении границы «дно-вода» происходит окончательное разделение нефти – «тяжёлые» углеводороды кристаллизуются с образованием битумных построек, а «лёгкие» всплывают к поверхности (Горшков и др., 2010).

Метагеномный анализ ампликонов гена 16S рРНК суммарной ДНК, выделенной из битумных построек №3 и №8, выявил наличие широкого спектра микроорганизмов, принадлежащих к разным таксонам (рис. 2). Представители класса *Actinobacteria* (куда входит род *Rhodococcus*) присутствуют в обеих постройках (4,3 % и 3,6 %, соответственно).

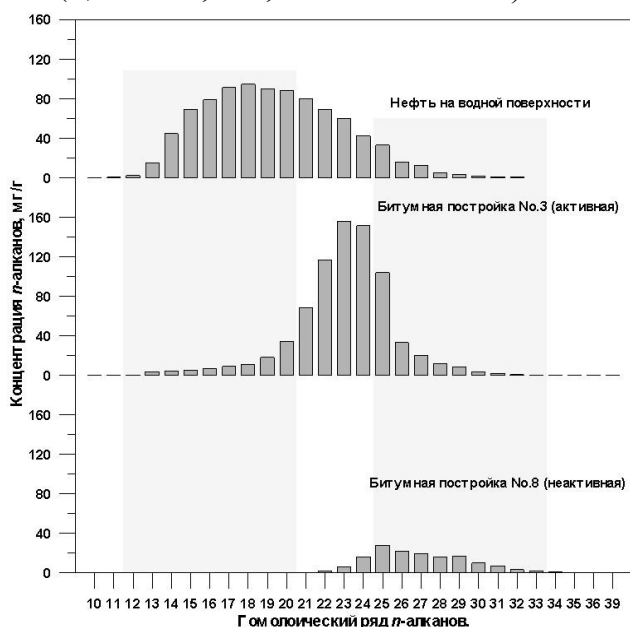


Рис. 1. Содержание *n*-алканов в нефти, собранной с водной поверхности и в активной и неактивной битумных постройках.

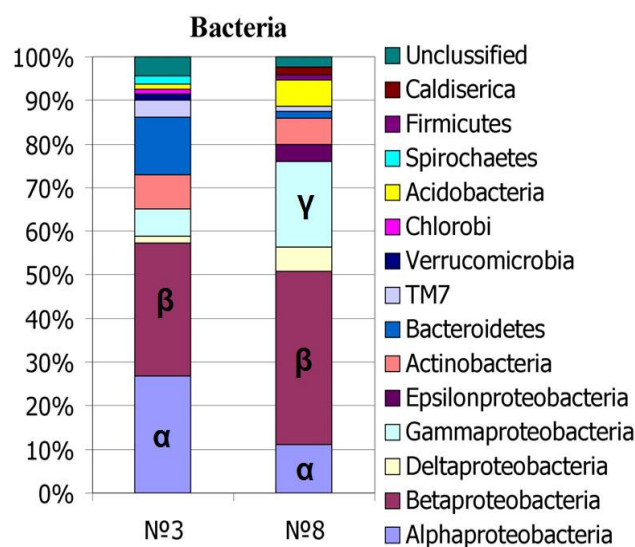


Рис. 2. Состав бактериального сообщества в битумных постройках №3 (активная) и №8 (неактивная) по данным метагеномного анализа (ген 16S рРНК).

При посеве битума на среду, где единственным источником углерода была стерильная нефть, из множества визуально одинаковых выпуклых, круглых, блестящих слизистых колоний бледно-розового цвета с ровным краем диаметром 1-3 мм (рис. 3А) было выделено 5 штаммов. В суточной культуре клетки были неподвижны, грам-положительны, имели палочковидную форму: длина 1,5 мкм, диаметр 0,52 мкм (рис. 3Б). На шестые сутки в культуре преобладали кокки (диаметром 0,7 мкм), в меньших количествах встречались короткие палочки длиной 0,8 мкм и диаметром 0,6 мкм (рис. 3В). Выделенные штаммы обладали морфологическими свойствами типичных представителей рода *Rhodococcus* (Alvarez, 2010). Клетки имели сложную клеточную стенку и внутриклеточную перегородку, характерную для представителей семейства *Nocardiaceae* (Scott and Finnelly, 1976) (рис. 3Г).

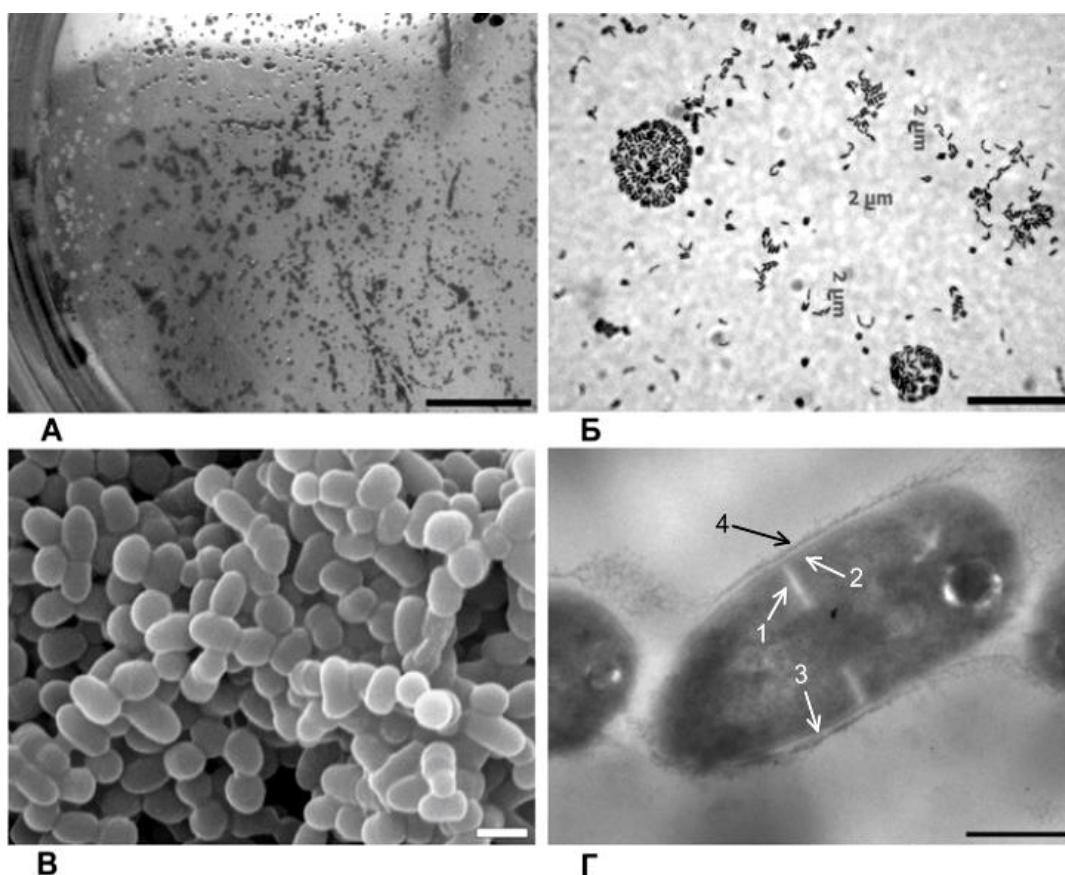


Рис. 3. Микроскопический анализ штаммов. А – колонии на чашке Петри, посеянные из битума постройки №8; Б – гомогенная культура под световым микроскопом; В – шестидневная культура под СЭМ; Г – ультратонкий срез клетки бактерии под ТЭМ. На фотографии ультратонкого среза стрелками обозначено: 1 – перегородка; 2 – плазмалемма; 3 – слой, состоящий из пептидогликана; 4 – слой, состоящий из арабиногалактана. Масштаб: А – 1 см; Б – 10 мкм; В – 1 мкм; Г – 250 нм.

Все выделенные штаммы являются аэробами и растут в диапазоне от +4 до +37 °С, при оптимуме 22 °С. Штаммы не давали роста при +46 °С. При добавлении в среду NaCl в концентрации 3 и 5 % отмечен рост бактерий, который прекращался при 8 %. Отмечена чувствительность к лизоциму (5 мкг/мл). Все штаммы образовывали продукты, сдвигающие рН среды в щелочную область, утилизировали цит-

раты, рамнозу, рафинозу, мальтозу, арабинозу, аммонийный и нитратный азот, не дезаминировали фенилаланин, тирозин, дульцит, инозит, сорбит, маннит, адонит. У всех штаммов обнаружено наличие орнитиндекарбоксилазы, лизиндекарбоксилазы, аргининдегидролазы и уреазы. Отрицательный результат дали тесты на образование индола и сероводорода, газообразование, наличие β -галактозидазы. Штаммы №1, 2 и 4 не утилизируют глюкозу, лактозу, фруктозу, ксилозу, сахарозу, галактозу. Для штамма №5 через 48 ч отмечено слабое окисление фруктозы, сахарозы, лактозы, глюкозы, а штамм №3 деградировал эти субстраты существенно. Это роднило их с типовым штаммом *R. erythropolis* DSM 43066. В отличие от последнего (Alvarez, 2010), ни один штамм не деградировал сорбит.

По структуре гена 16S рРНК выделенные штаммы с гомологией 99-100 % отнесены к роду *Rhodococcus*. Штаммы №1-4 гомологичны штамму *R. erythropolis* TT07R-57 (AB546303), №5 – *R. erythropolis* DLC-terla (EU043316). Среди гомологов штаммов №1-4 представлены углеводородокисляющие бактерии рода *Rhodococcus*, выделенные из почв, загрязнённых нефтью. Одним из гомологов, помимо выше упомянутого, штамм №5 является микроорганизм *R. globerulus* AZ1-15, выделенный из сильвинитных шахт. Физиологический анализ 5 штаммов из постройки №8 с 12 штаммами из постройки №3, 18 из водной толщи и 5 из осадка у м. Горевой Утес показывает их филогенетическое родство (отмечено пунктиром) (рис. 4).

Глава 5. Идентификация генов у выделенных штаммов *Rhodococcus erythropolis*, участвующих в деструкции *n*-алканов

По данным ПЦР-анализа у штамма №2 обнаружены *alkB1-1* и *alkB3*-гены, у остальных – только *alkB3*-гены. Структура нуклеотидных последовательностей фрагментов *alkB*-генов всех штаммов имеет сходство со структурой аналогичных генов представителей рода *Rhodococcus*. Последовательности *alk*-генов выделенных 5 штаммов сравнили с аналогичными последовательностями штаммов из битумной постройки №3, из осадка и водной толщи исследуемого района (рис. 5).

AlkB-гены штаммов №4 и №5 располагаются на отдельных ветвях и кластеризуются с последовательностями, полученными из активной постройки и из водной толщи, что может свидетельствовать о специфичности данных *alk*-генов. Последовательности 1, 2 и 3 имеют структуры, схожие с фрагментами генов одного из видов рода *Rhodococcus* (рис. 5).

Проведен первый раунд секвенирования полного генома штамма №4. Из полученных чтений удалось собрать контиги, из которых затем были собраны полные последовательности пяти *alk*-генов этого штамма. Они были сопоставлены с соответствующими генами из полного генома *R. erythropolis* PR4 (Seike et al., 2006) морского происхождения и с последовательностями фрагментов *alkB*-генов, описанных в предыдущем разделе. Оказалось, что четыре *alk*-гена штамма №4 значительно отличаются друг от друга по последовательностям нуклеотидов, но каждый

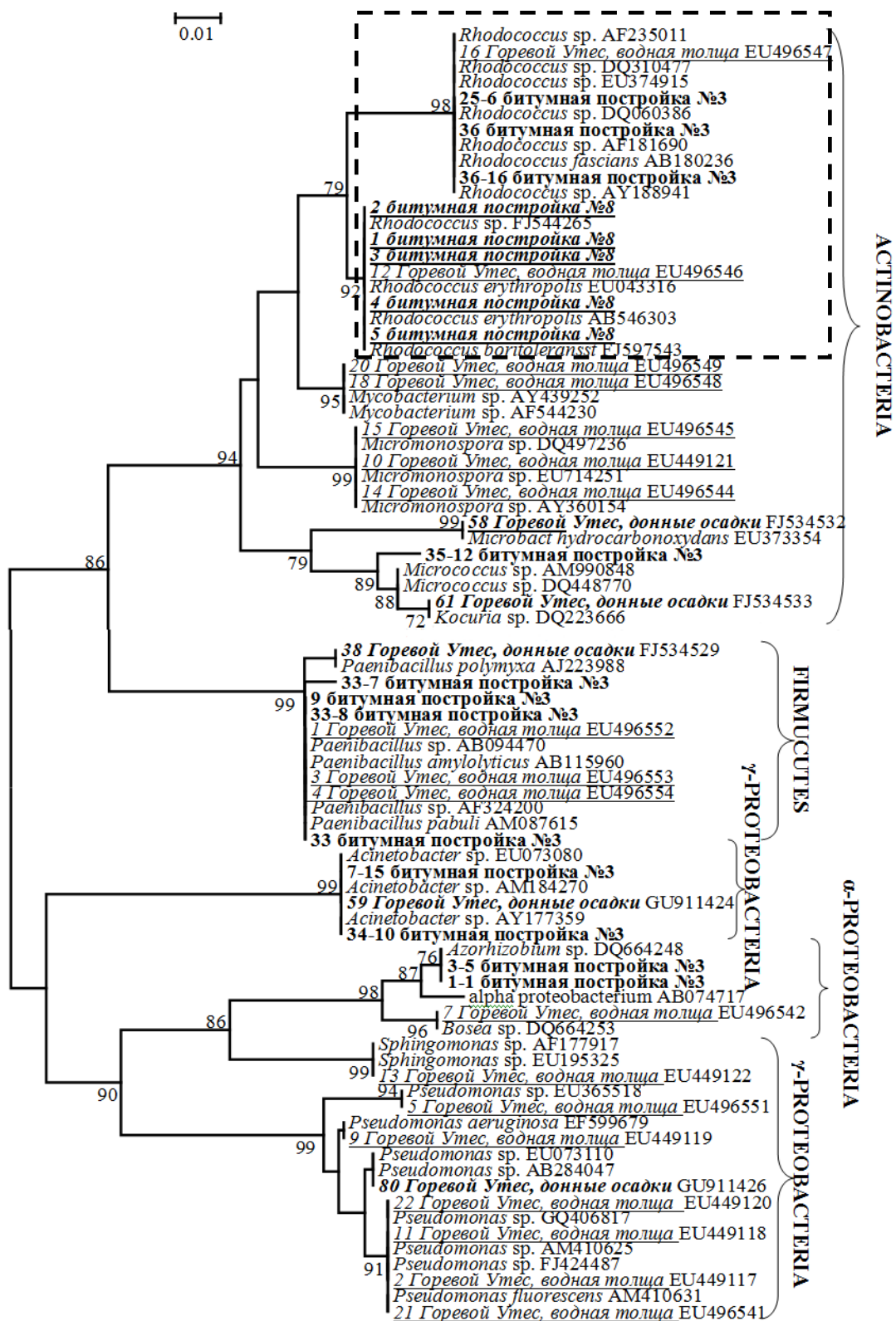


Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК чистых культур аэробных микроорганизмов, изолированных из водной толщи и битумных построек и осадка района естественного нефтепроявления м. Горевой Утес на озере Байкал. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на каждые 100 нуклеотидов.

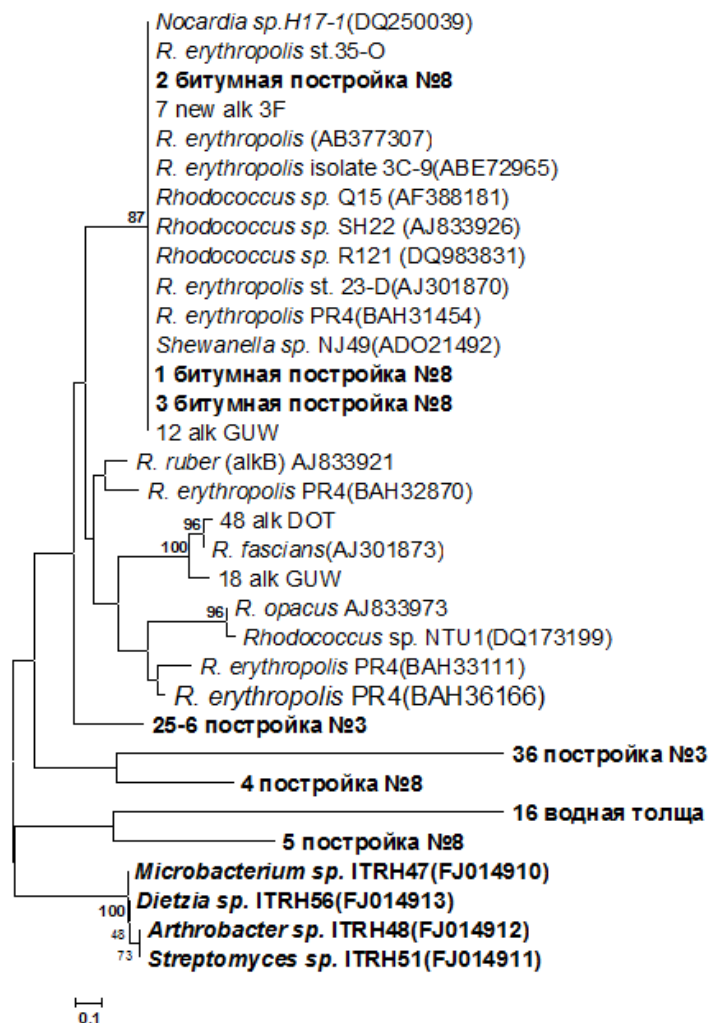


Рис. 5. Филогенетическое положение 5 штаммов из битумной постройки №8 относительно гомологов и штаммов из битумной постройки №3 и осадка, отобранного в районе естественного нефтепроявления у м. Горевой Утёс, определённое исходя из анализа нуклеотидных последовательностей *alkB*-генов Масштаб: 10 нуклеотидных замен на каждые 100 нуклеотидов.

из них имеет весьма близкого аналога среди 4 расшифрованных *alk*-генов *R. erythropolis* PR4. Это позволяет предположить, что *alk*-гены, присутствующие в геноме штамма №4, выполняют несколько различающихся функций, например, кодируют ферменты, обладающие способностью окислять алканы различной длины.

Глава 6. Исследование выделенных штаммов *Rhodococcus erythropolis* в лабораторных условиях

В эксперименте установлено, что все штаммы утилизируют с разной интенсивностью *n*-алканы с длиной цепи C₂₃-C₂₉, концентрация других гомологов уменьшалась равномерно (рис. 6). В состав постройки №8 входят *n*-алканы с длиной цепи C₂₂-C₃₄ (рис. 1), а выделенные нами штаммы микроорганизмов утилизируют *n*-алканы C₁₂-C₂₉. Таким образом, отсутствие *n*-алканов C₁₂-C₂₁ в постройке частично может быть обусловлено их потреблением бактериями, в том числе и представителями рода *Rhodococcus*.

У штамма *R. erythropolis* №4 была исследована способность продуцировать биосурфактанты. Для этого при 22 °С проводили культивирование в течение 456 ч в присутствии *n*-гексадекана в качестве единственного источника углерода. Через 240 ч в культуральной жидкости под слоем гексадекана образовались флоккулы, которые в покое слипались друг с другом, увеличиваясь в размере. При возобновлении перемешивания, они разрушались и оставались лишь мелкие. Флоккулы проэкстрагировали реактивом Фолча, а экстракт проанализировали методом двумерной тонкослойной хроматографии. При опрыскивании водой наряду с пятнами, расположившимися на диагонали, были обнаружены пятна, сместившиеся от диагонали вниз. Известно, что в число биосурфактантов продуцируемых родококками входят гликолипиды, в частности, трегалозодимиколат. Остатки глюкозы в последнем образуют отрицательно заряженный боратный комплекс. Очевидно, что упомянутые выше пятна могут принадлежать такому гликолипиду.

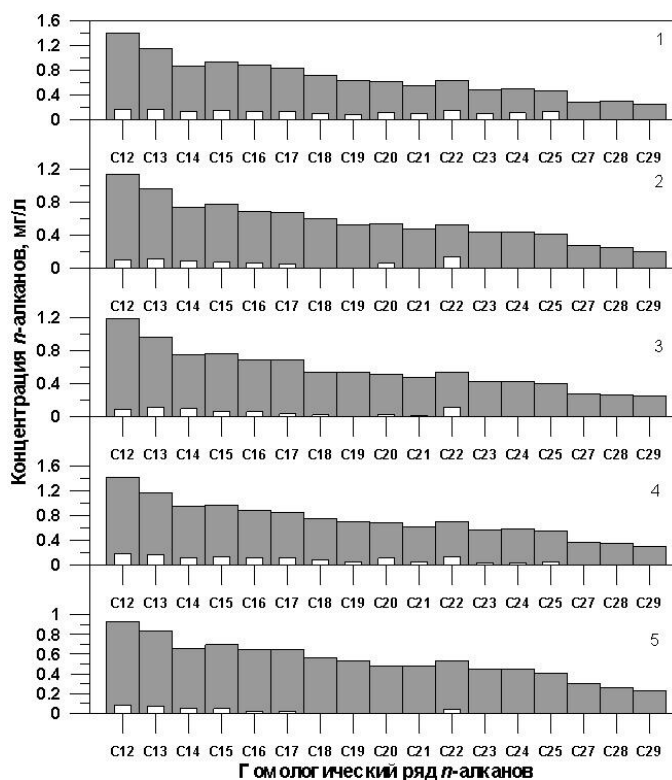


Рис. 6. Деградация *n*-алканов выделенными штаммами *R. erythropolis* в среде Раймонда в присутствии нефти. Серые столбцы - начальные концентрации *n*-алканов, белые – конечные, через 92 ч при 22 °С.

ВЫВОДЫ

1. В битумных постройках, обнаруженных в районе естественного выхода нефти в Байкале на глубине 900 м, обитают микроорганизмы, относящиеся к доменам *Archaea* и *Bacteriae*. С помощью метагеномного анализа гена 16S рНК в активной постройке выявлено 4520 и 5197 различных последовательностей архей и бактерий, соответственно, в которые входят представители семейства *Methanosarcinales* (46%), классов бета- (25%) и гаммапротеобактерий (12%). В неактивной постройке выявлено 1401 и 2200 последовательностей архей и бактерий, соответственно, включающих представителей семейства *Methanomicrobiales* (38%), классов альфа- (15%) и бетапротеобактерий (16%). Их соотношение зависело от экологических условий.
2. Из всего разнообразия микроорганизмов, из неактивной постройки культивированием на среде, где в качестве единственного источника углерода была нефть,

удалось выделить в чистые культуры 5 активных штаммов микроорганизмов-деструкторов нефти рода *Rhodococcus*. На основании анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, морфологических и физиолого-биохимических свойств они отнесены к виду *R. erythropolis*. Выделенные штаммы обладают способностью расти в широком диапазоне температур (от +4 до +37 °С) и при различной концентрации NaCl (3 и 5 %).

3. С помощью ПЦР-анализа у всех 5 штаммов удалось выявить *alk*-гены, у одного штамма эти гены полностью расшифрованы.
4. В лабораторных экспериментах показано, что все выделенные штаммы *R. erythropolis* за 92 ч на 60-100 % утилизируют C₁₂-C₂₉ *n*-алканы, входящие в состав битума построек и разгружающейся нефти. Отсутствие в структуре *n*-алканов C₁₂-C₂₁ обусловлено их биodeградацией микроорганизмами. Из культуры штамма №4 выделены гликолипиды.
5. Сумма полученных данных вносит существенный вклад в понимание процессов биodeградации углеводородов в оз. Байкал и описывает новые возможности для практических применений родококков – деструкторов нефти.

Содержание диссертации опубликовано в следующих работах

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Лихошвай А.В. Донные битумные постройки и населяющая их биота по данным обследования озера Байкал с глубоководных обитаемых аппаратов «Мир» / О.М. Хлыстов, Т.И. Земская, Т.Я. Ситникова, И.В. Механикова, И.А. Кайгородова, А.Г. Горшков, О.А. Тимошкин, О.В. Шубенкова, С.М. Черницына, А.В. Ломакина, А.В. Лихошвай, А.М. Сагалевич, В.И. Москвин, В.И. Пересыпкин, Н.А. Беляев, М.В. Слипенчук, А.К. Тулохонов, М.А. Грачев / Доклады Академии Наук. 2009. Т. 428. №5. С. 1-4.
2. Лихошвай А.В. Микробные сообщества в районах естественных выходов нефти на озере Байкал / О.Н. Павлова, А.В. Ломакина, А.В. Лихошвай, Г.А. Фёдорова, Т.А. Шишлянникова, Е.С. Корнева, С.В. Букин, Т.И. Земская / Успехи наук о жизни. 2010. №2. С. 169-172.
3. Likhoshvay A. The chemical composition and oil-degrading rhodococci of a deep-water bitumen mound on the bottom of Lake Baikal / A. Likhoshvay, T. Khanaeva, A. Gorshkov, T. Zemskaya, M. Grachev // Geomicrobiology Journal. 2011 (принята в печать).
4. Лихошвай А.В. Микробные сообщества и их способность окислять N-АЛКАНЫ в районе разгрузки газо-нефтеcодержащих флюидов в Среднем Байкале (м. Горевой Утес) / О. Н. Павлова, А. В. Ломакина, А. Г. Горшков, М. Ю. Суслова, А. В. Лихошвай, Т. И. Земская // Известия РАН. 2011 (на рецензии в журнале).

Тезисы и материалы конференций:

1. Лихошвай А.В. Микробные сообщества, участвующие в деградации углеводородов в озере Байкал. / Т.И. Земская, О.В. Шубенкова, С.М. Черницына, А.В. Ло-

- макина, А.В. Лихошвай, О.Н. Павлова // Материалы «IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов». – Новосибирск, 2008, С. 136.
2. Лихошвай А.В. Микробные сообщества и фауна холодных сипов и грязевых вулканов в осадках озера Байкал / Т.И. Земская, Т.Я. Ситникова, О.В. Шубенкова, С.М. Черницына, А.В. Ломакина, О.Н. Павлова, И.В. Механикова, А.В. Лихошвай, О.М. Хлыстов // X Съезд Гидробиологического общества при РАН. – Владивосток, 2009. С. 155.
 3. Лихошвай А.В. Биологическое сообщество битумных построек из района нефтепроявления у м. Горевой Утёс, Средний Байкал // С.М. Черницына, А.В. Лихошвай, А.В. Ломакина, О.Н. Павлова Т.И., Земская, Т.Я. Ситникова // Пятая Верещагинская Байкальская конференция, Международная научная школа для молодежи «Экология крупных водоемов и их бассейнов», 16 объединенный семинар по проблемам изучения региональных осадений из атмосферы: тезисы докладов и стендовых сообщений. – Иркутск, 2010. С. 126-127.
 4. Лихошвай Ал.В. Бактерии из битумных построек на дне озера Байкал, деградирующие нефть / Ал.В. Лихошвай, Т.А. Ханаева, А.В. Ломакина, А.Г. Горшков, О.Н. Павлова, Т.И. Земская, М.А. Грачёв, М.В. Слепенчук // Там же. С. 139-141.
 5. Лихошвай А.В. Первые результаты поиска углеводородокисляющих бактерий, изолированных из оз. Байкал - продуцентов поверхностно-активных веществ / О.Н. Павлова, Г.А. Федорова, Т.А. Шишлянникова, Е.С. Корнева, А.В. Лихошвай, С.В. Букин, А.В. Ломакина, Т.И. Земская // Там же. С. 149-150.
 6. Likhoshway A.V. Comparative description of communities from bottom sediments at two sites of natural oil seeps in Lake Baikal: analysis of nucleotide sequences of 16S rRNA gene / A.V. Lomakina, O.N. Pavlova, A.V. Likhoshway, A.G. Gorshkov, V.I. Moskvina, I.V. Morozov, V. Nisheta, T.I. Zemskaya // 10th International Conference on Gas in Marine Sediments. – Listvyanka (Lake Baikal), 2010. P. 122.
 7. Likhoshvay Al.V. The Chemical composition and oil-degrading bacteria of a deep water bitumen mound in Lake Baikal / Al.V. Likhoshvay, T.A. Khanaeva, T.I. Zemskaya // 32nd Annual Lorne Genome Conference, 2011. P. 385.
 8. Лихошвай А.В. Сравнительная характеристика микроорганизмов р. *Rhodococcus* и р. *Pseudomonas*, образующих биосурфактанты / О.Н. Павлова, А.В. Лихошвай, Г.А. Федорова, Т.А. Шишлянникова, С.В. Букин, А.В. Ломакина, Т.И. Земская // Материалы 3-го Байкальского Микробиологического Симпозиума с международным участием. – Иркутск, 2011. С. 94.