

УДК 579.222+57.083+574.635

УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИЕ БАКТЕРИИ ДОННЫХ ЭКОТОПОВ БАРЕНЦЕВА И ПЕЧОРСКОГО МОРЕЙ

© 2024 г. В. О. Пыркин^{а, *}, Л. А. Гавирова^а, А. Р. Строева^а, А. Ю. Меркель^б, О. Н. Видищева^а,
А. Г. Калмыков^а, Е. А. Бонч-Осмоловская^{а, б}

^аМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

^бИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: vladisluw@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.10.2023 г.

После исправления 14.11.2023 г.

Принят к опубликованию 17.11.2023 г.

Микроорганизмы, способные к утилизации углеводов, являются естественными компонентами микробных сообществ природных местообитаний и играют важную роль в самоочищении морских акваторий от нефтяных загрязнений. С помощью высокопроизводительного секвенирования переменного участка V4 гена 16S рРНК был проведен анализ микробных сообществ Баренцева и Печорского морей, а также микрокосмов, полученных на спектре углеводородных субстратов: нефть, н-нонан, н-ундекан и фенантрен. Сообщества углеводородоокисляющих микроорганизмов Баренцева моря характеризуются доминированием родов *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Porticoccus*, *Oleispira*, в то время как углеводородоокисляющие сообщества Печорского моря содержат бактерии родов *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Sphingorhabdus* и *Hyphomonas*. Чистые культуры этих организмов продемонстрировали способность к использованию основных углеводов нефти: н-алканов, циклоалканов и ароматических соединений.

Ключевые слова: Баренцево море, Печорское море, микробное разнообразие, высокопроизводительное секвенирование, ген 16S рРНК, углеводородоокисляющие микроорганизмы

DOI: 10.31857/S0026365624030081

Арктические моря являются важным ресурсом с точки зрения имеющихся в них запасов углеводов: по данным геологоразведки в них находится большая часть мировых запасов нефти и газа (Патин, 2017). Акватории Баренцева, Печорского и Карского морей считаются самыми ресурсоемкими; в их пределах сосредоточено около 62.7% суммарных геологических ресурсов акватории РФ (Еремин и соавт., 2010). Перспектива разработки нефтяных месторождений в Баренцевом и Печорском морях делает актуальным исследование микробного разнообразия в этих местообитаниях, так как важно понимать, насколько природные микробные сообщества арктических морей способны справиться с нефтяными загрязнениями, неизбежно сопутствующими разработке месторождений углеводов. Баренцево море является самым западным морем Арктики и находится под значительным влиянием Атлантического океана, в результате чего более соленая и теплая вода Атлантики смешивается с холодной и более пресной водой Арктики. Печорское море является заливом Баренцева моря, образуемым впадением в него реки

Печоры, и характеризуется пониженной, по сравнению с Баренцевым морем, соленостью (Rogozhin et al., 2023).

Целью настоящей работы было изучение углеводородоокисляющих микроорганизмов Баренцева и Печорского морей и их потенциала к биоремедиации путем анализа микробных сообществ придонных экотопов и микрокосмов, полученных в присутствии различных углеводородных субстратов.

В работе анализировались образцы придонной воды и грунта из северной части Баренцева моря и центральной части Печорского моря. Пробоотбор в Баренцевом море осуществлялся в августе 2020 года и в сентябре–октябре 2021 года в ходе рейсов ТТР-19 и ТТР-20 НИС “Академик Николай Страхов”. Пробоотбор в Печорском море осуществлялся в августе 2020 года на ИС “Картеш”. Образцы придонной морской воды отбирали батометром Нискина (ИС “Картеш”), или из верхней части гравитационной трубы (НИС “Академик Николай Страхов”). Для концентрации клеток микроорганизмов и их последующего анализа морскую воду

в объеме 2 л после доставки на борт судна фильтровали через систему стекловолоконного предфильтра (Glass Fiber Filter Membrane Filters, “GVS”) и мембранного фильтра с диаметром пор 0.22 мкм (“Merck”). Образцы грунта отбирали из верхних слоев донных отложений глубиной 0–5 см, с помощью дночерпателя (ИС “Картеш”) или гравитационной трубы (НИС “Академик Николай Страхов”).

Сообщества углеводородокисляющих микроорганизмов были получены методом микрокосмов в два этапа. На первом этапе образцы придонной морской воды и грунта в количестве 5% от объема минеральной среды ONR7a (Dyksterhouse et al., 1995) культивировали в присутствии нефти 0.2% (Oil) и без внесения углеводородного субстрата (Control_oil) в течение 7 сут. На втором этапе полученную культуру пересеивали на индивидуальные углеводороды – н-нонан (Nonane), н-ундекан (Undecane), фенантрен (Phenantrene) и отдельно вели контрольную линию (Control_HC) (рис. 1). Культивирование проводили в орбитальном шейкере (“New Brunswick”, Германия) в пластиковых пробирках объемом 50 мл с закручивающимися крышками при 15°C и 180 об./мин. Выделение чистых культур проводили при температуре 15°C на твердых агаризованных средах: ONR7a с внесением углеводородов и Plate Count Agar (PCA) (г/л): K_2HPO_4 – 1.5; KH_2PO_4 – 0.75; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1.0; $(NH_4)_2SO_4$ – 4.0; NaCl – 30; гидролизат казеина – 5.0; дрожжевой экстракт – 2.5; D(+)-глюкоза – 1.0; дистиллированная вода, pH 7.0. Концентрацию клеток микроорганизмов в образцах придонной воды оценивали методом люминесцентной микроскопии с окрашиванием акридином оранжевым. В грунте абсолютную численность бактерий оценивали методом ПЦР в реальном времени с использованием универсальных праймеров на V4 участок гена 16S рРНК: Pro515F и Pro-mod-805R (Hugerth et al., 2014, Меркель и соавт., 2019). Реакцию проводили с использованием готовой смеси для ПЦР qPCRMix-HS SYBR (“Евроген”, Россия) на приборе StepOnePlus (“Thermo Fisher Scientific”, США). Для выделения образцов тотальной ДНК из природных образцов и микрокосмов использовали коммерческий набор FastDNA SPIN Kit for Soil (“MP Biomedicals”, США). Библиотеки участка V4 генов 16S рРНК для высокопроизводительного секвенирования на системе Illumina MiSeq готовили по двухэтапной схеме ПЦР, описанной Gohl et al. (2016). Профили микробных сообществ придонной морской воды, донных отложений и микрокосмов по гену 16S рРНК были получены с помощью ПЦР и высокопроизводительного секвенирования нового поколения (Illumina MiSeq). Для обработки нуклеотидных последовательностей был использован метод ASV (Caruso et al., 2019). ASV-таблица была создана с помощью ПО Dada2 (Callahan et al., 2016) и базы данных SILVA 138 (Quast et al., 2013). Последовательности фрагментов гена 16S рРНК были

депонированы в базе данных SRA (NCBI) под номером биопроекта PRJNA980746, PRJNA1005790. Для амплификации последовательности гена 16S рРНК выделенных чистых культур использовали праймеры 27F и 1492R. Анализ хроматограмм проводили в программе BioEdit. Для анализа полученных последовательностей использовали базу данных BLASTn. Степень деструкции углеводородов определяли с помощью газо-жидкостной хроматографии на газовом хроматографе Agilent 8890 (США), соединенном с масс-селективным детектором 5977В с высокоэффективным источником ионизации Inert plus.

Из 20 образцов придонной морской воды, 7 образцов донных отложений из Баренцева моря, 6 образцов придонной морской воды и 6 образцов донных отложений из Печорского моря была определена абсолютная численность клеток микроорганизмов, выделена ДНК и, методом NGS, по гену 16S рРНК проанализирован состав микробных сообществ.

Численность прокариот в 1 мл придонной морской воды составила от 1.36×10^5 до 4.5×10^7 кл./мл. В образцах грунта концентрация микроорганизмов варьировала 1.5×10^7 до 6×10^9 кл./см³. В микробных сообществах придонной воды Баренцева моря доминировали представители *Neptunomonas* от 6.4 до 50%, *SUP05 (Pseudomonadota)* от 1.8 до 15.5%, *Nitrosopumilus* от 1.6 до 13.9%, неидентифицированные представители семейства *Nitrincolaceae* от 2 до 13.3%, морские органогетеротрофы *Polaribacter* от 1.2 до 12.6%, *Luteolibacter* от 1.2 до 11%, *Clade Ia (Pseudomonadota)* от 1.7 до 10.6%, некультивируемые сульфатредукторы *Sva0081_sediment_group (Desulfobacterota)* от 1.1 до 9.8%. Микробные сообщества донных отложений Баренцева моря характеризовались преобладанием неидентифицированных бактерий из семейств *Hyphomicrobiaceae* от 7.4 до 22.3%, *Desulfocapsaceae* от 4.2 до 8.1%, *Desulfobulbaceae* от 1.4 до 5.9%, а также некультивируемых бактерий рода *Sva0081_sediment_group (Desulfobacterota)* от 2.3 до 10%.

Микробные сообщества придонной воды Печорского моря были представлены некультивируемыми бактериями *OM60(NOR5)_clade (Pseudomonadota)* от 3 до 23.8% во всех исследованных образцах, неидентифицированными представителями семейства *Nitrincolaceae* от 14 до 21.8% и *Amylibacter* от 12.8 до 16.6%. В грунтах Печорского моря доминировали миксобактерии из семейства *Sandaracinaceae* от 7.5 до 26.7%, органогетеротрофные бактерии рода *Woeseia* от 2.4 до 24% и неклассифицированные *Actinomarinales* от 4.5 до 10%.

Из 38 микрокосмов с нефтью и 32 с индивидуальными углеводородами (н-нонан, н-ундекан и фенантрен), добавленными в качестве источника углерода и энергии, была выделена и проанализирована ДНК (рис. 1).

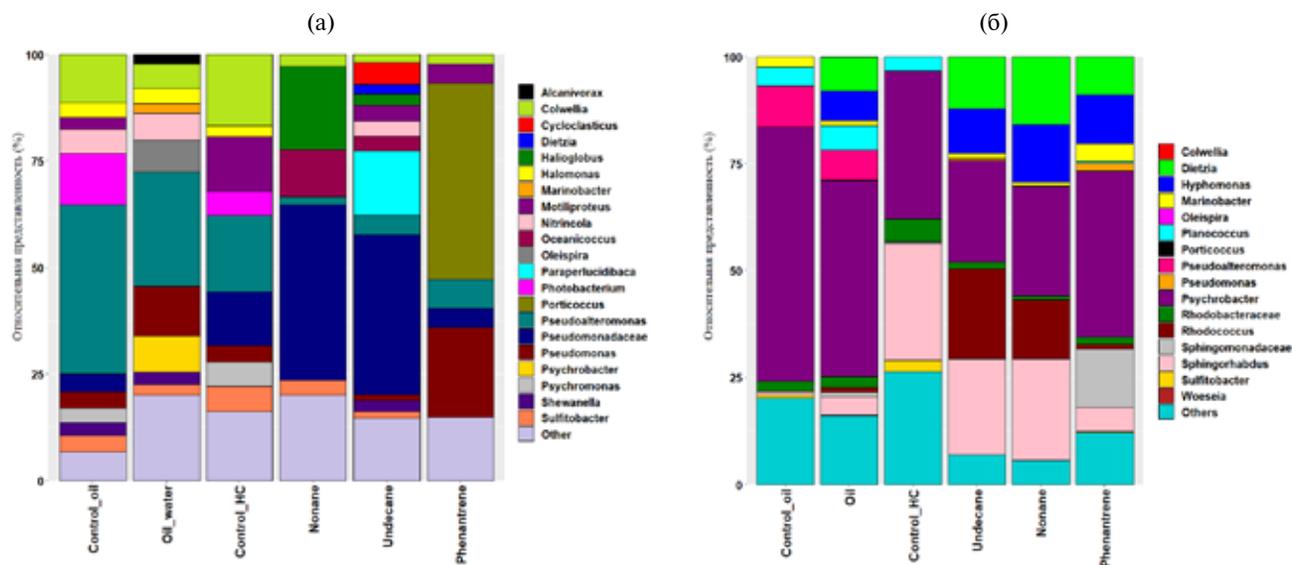


Рис. 1. Усредненный филогенетический состав сообществ микрокосмов из придонной воды и грунта Баренцева (а) и Печорского (б) морей, полученный путем NGS профилирования по гену 16S rPHK.

Также были проанализированы 22 микрокосма, культивируемых без внесения углеводородного субстрата. При культивировании придонной воды Баренцева моря в присутствии сырой нефти (рис. 1а, Oil) наблюдается увеличение, по сравнению с контролем (рис. 1а, Control_oil), относительного содержания бактерий родов *Pseudoalteromonas* с 5.4 до 33.16%, *Pseudomonas* с 0.48 до 15.57%, *Oleispira* с 0.94 до 10.04%. Добавление н-алканов привело к увеличению содержания неидентифицированных членов семейства *Pseudomonadaceae* с 8.1 до 41.14% в случае н-нонана (рис. 1а, Nonane) и до 37.63% (рис. 1а, Undecane). Использование фенантрена также стимулировало изменение состава микробного сообщества: было отмечено увеличение содержания бактерий родов *Porticoccus* с 0.32 до 46.01% и *Pseudomonas* с 5.02 до 21.09% (рис. 1а, Phenantrene).

Использование нефти в микрокосмах, полученных путем инкубирования смеси придонной воды и грунтов Печорского моря, приводило к доминированию, по сравнению с контролем, представителей рода *Dietzia* с 0.02 до 10.24%, *Hyphomonas* с 0.002 до 4.33%, *Sphingorhabdus* с 0.32 до 4.32% (рис. 1б, Oil). При посеве микробного сообщества на н-нонан и н-ундекан (рис. 1б, Nonane, Undecane) доминирующими таксонами были роды *Sphingorhabdus* (23.61 и 22.08%), *Rhodococcus* (13.76 и 20.97%), *Dietzia* (15.94 и 12.26%) и *Hyphomonas* (13.45 и 10.32%). В случае использования фенантрена микробными сообществами Печорского моря возрастало относительное количество бактерий родов *Dietzia* с 0.04 до 10.24% и *Hyphomonas* с 0.05 до 10.24% (рис. 1б, Phenantrene).

Таким образом, установлено, что при инкубировании придонной воды и грунта Баренцева и Печорского морей в присутствии углеводородных субстратов в микробных сообществах наблюдается существенное увеличение доли бактерий ряда таксонов. Не все перечисленные таксоны были представлены хотя бы в одной группе природных образцов, что могло быть связано с их предельно низким количеством в исследуемой пробе. В то же время в экспериментах с микрокосмами в присутствии углеводородных субстратов они оказались способными занимать доминирующее положение. Таксоны, доминирующие в микрокосмах, полученных из образцов Баренцева моря, помимо своей способности к утилизации углеводородов, ассоциированы с цветением фитопланктона. Фитопланктон, в свою очередь, может являться источником углеводов в мировом океане, в результате чего создается так называемый краткосрочный цикл углеводов (Lea-Smith et al., 2015). В микрокосмах из Печорского моря доминировали бактерии, которые исследователи обычно ассоциируют с территориями, хронически загрязненными нефтью (Carvalho et al., 2014; Wang et al., 2016; Nölvak et al., 2021).

Из полученных микрокосмов были выделены чистые культуры представителей родов *Pseudoalteromonas*, *Janibacter*, *Rhodoglobus*, *Rhodococcus*, *Psychrobacter*, для которых была изучена способность к утилизации углеводов нефти. Для оценки утилизации линейных алканов использовались соотношения пристана (Pr) к н-гептадекану (н-С₁₇) и фитана (Ph) к н-октадекану (н-С₁₈). Пристан и фитан слабо подвержены процессам биологического окисления, в то время как исчезновение н-С₁₇ и н-С₁₈ в нефтях является первым признаком биodeградации (Гордадзе и соавт., 2015).

Значения соотношений Pr/n-C₁₇ и Ph/n-C₁₈ в контроле (без внесения культуры бактерий) составляли 0.6 и 0.5. Соотношение пристана к фитану Pr/Ph, которое должно оставаться постоянным для исходной и подверженной микробному окислению нефти, как в контроле, так и в опытных образцах, составило 1.3–1.4. Установлено, что наиболее активно разлагали n-алканы бактерии родов *Rhodoglobus* (Pr/n-C₁₇ = 10 и Ph/n-C₁₈ = 10), *Dietzia* (4.2 и 4.2), *Rhodococcus* (2.3 и 2.7), *Pseudoalteromonas* (2.5 и 2.3); с меньшей интенсивностью – *Psychrobacter* (0.6 и 0.5) и *Janibacter* (0.7 и 0.5) (рис. 2а).

Биодеструкция ароматических соединений отслеживалась с помощью соотношения суммы метилнафталенов (MN) к диметилнафталенам (DMN) и триметилнафталенам (TMN): MN/(DMN + TMN); в контроле исследуемое соотношение составило 0.33. В процессе биодegradации значение данного индекса снижается за счет увеличения доли триметилнафталенов (Fisher et al., 1998). В деструкции алкильных нафталенов, входящих в состав нефти, активно участвовали бактерии родов *Janibacter*, соотношение MN/(DMN + TMN) = 0.04, *Rhodoglobus* – 0.06, *Dietzia* – 0.18,

Psychrobacter – 0.21, в то время как *Rhodococcus* – 0.36 и *Pseudoalteromonas* – 0.36 не показали активность утилизации ароматических соединений (рис. 2б).

Таким образом, таксоны, преобладавшие в составе микробных сообществ исследуемых донных экотопов Баренцева и Печорского морей, в целом являлись характерными для морских местообитаний, однако различались в случае образцов из двух исследованных морей. Отмеченные различия в составе микробных сообществ могут быть связаны как с флуктуационным характером солености, так и с большей близостью к берегу и возможной загрязненностью в местах отбора образцов в Печорском море. Последнее предположение подтверждается и составом микробных сообществ микрокосмов, использующих углеводородные субстраты. Микробные сообщества микрокосмов из образцов Баренцева моря характеризовались доминированием бактерий, ассоциированных с фитопланктоном, в то время как в микрокосмах из образцов Печорского моря преобладали представители родов с широким спектром потребления углеводородных субстратов. Выделенные в чистую культуру бактерии из сообществ микрокосмов способны

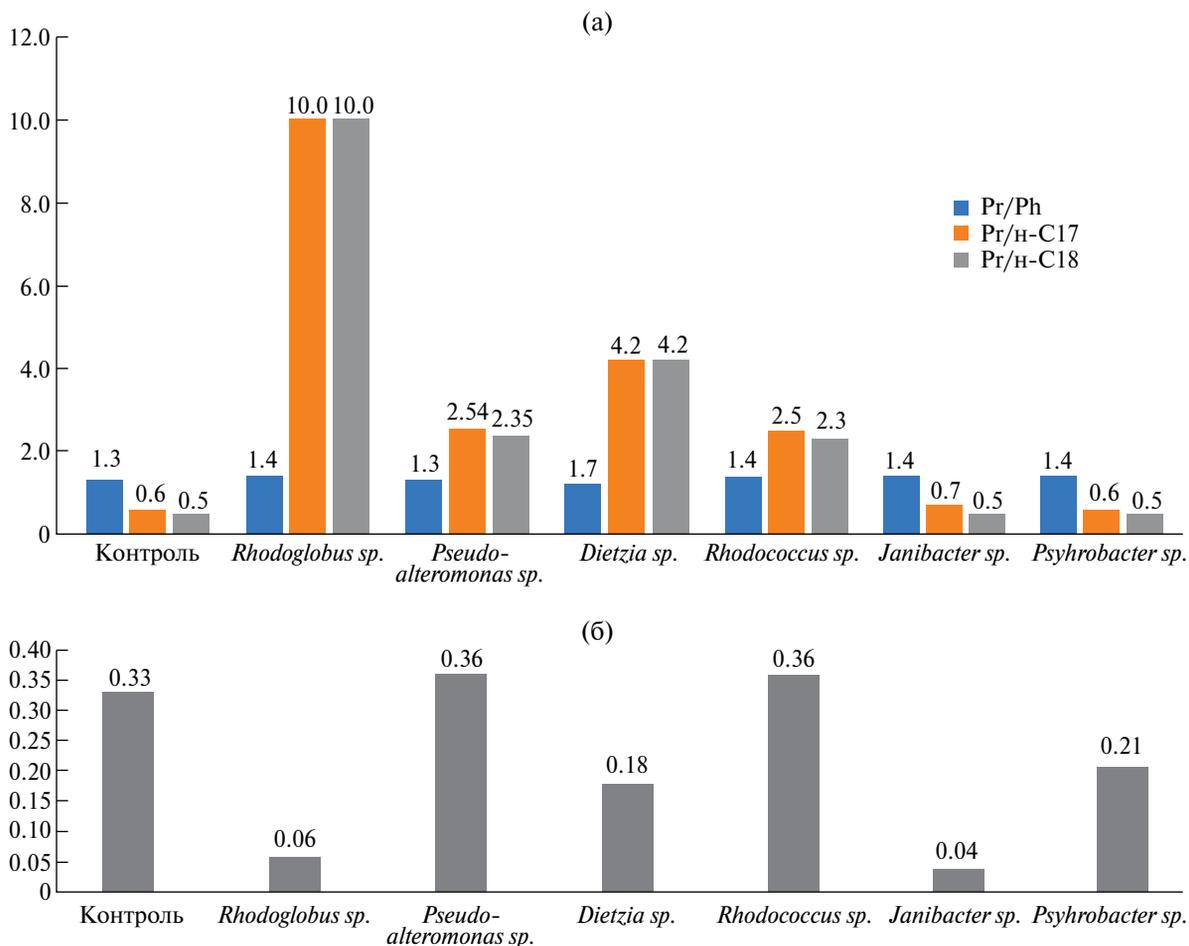


Рис. 2. Гистограмма значений соотношений маркеров биодegradации n-алканов (а) и ароматических соединений (б) исследованными чистыми культурами микроорганизмов.

окислять достаточно широкий спектр углеводородных субстратов, включающий n-алканы и ароматические соединения. Таким образом, установлено, что придонная вода Баренцева и Печорского морей обладает способностью к самоочищению от углеводородов нефти за счет утилизации компонентов нефти участниками микробных сообществ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов выражает благодарности Центру морских исследований МГУ имени М. В. Ломоносова за предоставление образцов грунта и воды Баренцева и Печорского морей, а также командам экспедиций ТТН19 и ТТН20 и экипажу НИС «Академик Николай Страхов» за помощь в пробоотборе донных отложений и морской воды Баренцева моря.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при поддержке проекта РФФИ № 20-54-20001 Норв_т.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гордадзе Г. Н., Гируц М. В., Пошибаева А. Р., Кошелев В. Н. Химия нефти с основами органической геохимии. М.: РГУ нефти и газа имени И. М. Губкина, 2015. 80 с.

Еремин Н. А., Кондратюк А. Т., Еремин А. Н. Ресурсная база нефти и газа арктического шельфа России // Георесурсы, геоэнергетика, геополитика. 2010. № 1 (1). С. 23.

Меркель А. Ю., Тарновецкий И. Ю., Подосокорская О. А., Тошчаков С. В. Анализ систем праймеров на ген 16S рРНК для профилирования термофильных микробных сообществ // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 655–664.

Merkel A. Yu., Tarnovetskii I. Yu., Podosokorskaya O. A., Toshchakov S. V. Analysis of 16S rRNA primer systems

for profiling of thermophilic microbial communities // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 671–681.

Патин С. А. Нефть и экология континентального шельфа. М.: Издательство ВНИРО, 2017. 284 с.

Callahan B. J., McMurdie P. J., Rosen M. J., Han A. W., Johnson A. J. A., Holmes S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data // Nature Methods. 2016. V. 13. P. 581–583.

Caruso V., Song X., Asquith M., Karstens L. Performance of microbiome sequence inference methods in environments with varying biomass // MSystems. 2019. V. 4. <https://doi.org/10.1128/msystems.00163-18>.

De Carvalho C. C. R., Costa S. S., Fernandes P., Couto I., Viveiros M. Membrane transport systems and the biodegradation potential and pathogenicity of genus *Rhodococcus* // Front. Physiol. 2014. V. 5. Art. 133.

Fisher S. J., Alexander R., Kagi R. I., Oliver G. A. Aromatic hydrocarbons as indicators of biodegradation in north Western Australian reservoirs // Sedimentary Basins of Western Australia: West Australian Basins Symposium / Ed. Purcell P. G., Purcell R. R. Perth, 1998. P. 185–194.

Gohl D. M., Vangay P., Garbe J., MacLean A., Hauge A., Becker A., Beckman K. B. Systematic improvement of amplicon marker gene methods for increased accuracy in microbiome studies // Nature Biotechnol. 2016. V. 34. P. 942–949.

Hugerth L. W., Wefer H. A., Lundin S., Jakobsson H. E., Lindberg M., Rodin S., Andersson A. F. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. P. 5116–5123.

Lea-Smith D. J., Biller S. J., Davey M. P., Cotton C. A., Perez Sepulveda B. M., Turchyn A. V., Howe C. J. Contribution of cyanobacterial alkane production to the ocean hydrocarbon cycle // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. P. 13591–13596.

Nölvak H., Dang N. P., Truu M., Peeb A., Tiirik K., O'Sadnick M., Truu J. Microbial community dynamics during biodegradation of crude oil and its response to biostimulation in Svalbard seawater at low temperature // Microorganisms. 2021. V. 9. Art. 2425.

Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Glöckner F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // Nucl. Acids Res. 2012. V. 41. D1. P. D590–D596.

Rogozhin V., Osadchiev A., Konovalova O. Structure and variability of the Pechora plume in the southeastern part of the Barents Sea // Front. Mar. Sci. 2023. V. 10. Art. 1052044.

Wang X. B., Chi C. Q., Nie Y., Tang Y. Q., Tan Y., Wu G., Wu X. L. Degradation of petroleum hydrocarbons (C6–C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain // Bioresour. Technol. 2011. V. 102. P. 7755–7761.

Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria of the Bottom Ecotopes of the Barents and Pechora Seas

V. O. Pyrkin¹, *, L. A. Gavirova¹, A. R. Stroeve¹, A. Yu. Merkel², O. N. Vidishcheva¹,
A. G. Kalmykov¹, and E. A. Bonch-Osmolovskaya^{1, 2}

¹*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

²*Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center of Biotechnology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia*

*e-mail: vladislav@yandex.ru

Received October 14, 2023; revised November 14, 2023; accepted November 17, 2023

Abstract—Microorganisms capable of degrading hydrocarbons are regular components of natural microbial communities and play an important role in self-purification of marine environments from oil contamination. High-throughput sequencing of the 16S rRNA gene V4 variable region was used to analyze microbial communities of the Barents and Pechora seas and of the microcosms with a spectrum of hydrocarbon substrates: oil, *n*-nonane, *n*-undecane, and phenanthrene. The Barents Sea communities of hydrocarbon-oxidizing microorganisms were characterized by predominance of the genera *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Porticoccus*, and *Oleispira*, while those of the Pechora Sea contained members of the genera *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Sphingorhabdus*, and *Hyphomonas*. Pure cultures of these microorganisms were shown to utilize the major oil hydrocarbons: *n*-alkanes, cycloalkanes, and aromatic compounds.

Keywords: Barents Sea, Pechora Sea, microbial diversity, 16S rRNA gene, hydrocarbon-oxidizing microorganisms