

УДК 579.66:579.22:579.26

ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ В ЯПОНСКОМ МОРЕ

© 2021 г. Е. А. Богатыренко^{1, *}, А. В. Ким^{1, 2}, Т. И. Дункай^{1, 3}, А. Л. Пономарева⁴,
А. И. Еськова^{1, 4}, М. Л. Сидоренко^{1, 2}, А. К. Окулов⁴

¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток 690950, Россия

²Федеральный научный центр биоразнообразия ДВО РАН, Владивосток 690022, Россия

³Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток 690041, Россия

⁴Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН, Владивосток 690041, Россия

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

Поступила в редакцию 09.07.2020 г.

После доработки 05.11.2020 г.

Принята к публикации 10.02.2021 г.

Из трех акваторий Японского моря с разным уровнем антропогенного загрязнения изолированы 137 штаммов мезофильных и психротолерантных углеводородокисляющих бактерий. Определена таксономическая принадлежность культивируемых бактерий из поверхностных вод и донного осадка, которые участвуют в биодеградации нефтяных углеводородов в данном регионе. Выделенные микроорганизмы относятся к филумам Actinobacteria, Firmicutes и Proteobacteria. Впервые углеводородокисляющая способность обнаружена у бактерий *Okibacterium* sp., *Lechevalieria flava*, *Patulibacter* sp., *P. minatonensis*, *Gracilibacillus massiliensis*, *Thalassobacillus* sp., *Virgibacillus dokdonensis*, *Chryseomicrobium amylolyticum*, *Jeotgalibacillus marinus*, *Moraxella osloensis*, *Idiomarina maritima* и *I. piscisalsi*. Полученные результаты позволили расширить знания о возможности биодеградации поллютантов представителями отдельных таксонов в морской среде.

Ключевые слова: биоразнообразие, углеводородокисляющие бактерии, нефть, углеводороды, Японское море

DOI: 10.31857/S0134347521030037

Экосистема Японского моря характеризуется уникальным разнообразием обитающих в нем организмов, что обусловлено своеобразными физико-географическими особенностями региона. Вместе с тем здесь наблюдается высокая степень антропогенного воздействия, связанная с увеличением численности населения, урбанизацией побережий, индустриализацией и развитием туризма. Источниками загрязнения Японского моря являются объекты целлюлозно-бумажной, электроэнергетической и нефтегазодобывающей промышленности, жилищно-коммунального хозяйства, а также судостроительные и судоремонтные предприятия, торговый и военно-морской флот. Высокая антропогенная нагрузка в прибрежье и в районах активного судоходства неизбежно приводит к хроническому загрязнению этих акваторий различными поллютантами, в том числе нефтью и нефтепродуктами (Огородникова, 2001).

Для сохранения и поддержания стабильности морских экосистем необходимы разработка и внедрение экологически безопасных методов борьбы с последствиями возможных нефтяных и топливных разливов. Наиболее перспективным способом решения этой проблемы может стать

биоремедиация с использованием широких возможностей метаболического потенциала морских микроорганизмов. Поиск микроорганизмов, способных к деструкции нефтяных углеводородов (НУ), в частности, в условиях низких температур, является актуальной научной задачей.

Исследования, проведенные в последние годы, свидетельствуют о целесообразности использования для биоремедиации аборигенных микроорганизмов, которые способны к деградации НУ в определенных экологических условиях. В связи с этим особое внимание необходимо уделять изучению видового разнообразия и биологических свойств микроорганизмов в конкретном регионе.

К наиболее распространенным в морской среде углеводородокисляющим микроорганизмам (УВОМ) относятся бактерии родов *Mycobacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus* и *Arthrobacter*. Как правило, их выделяют в районах с сильным нефтяным загрязнением (Коронелли и др., 1987, 1994; Алекперова, 2009). Способностью к окислению НУ обладают также бактерии родов *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Bacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus* и *Pseudomonas*. Другие представители УВОМ более специфичны для отдельных аквато-

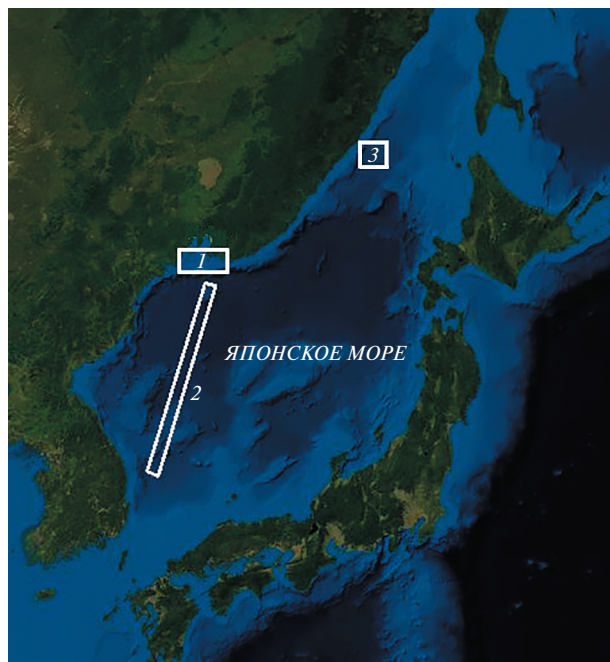


Рис. 1. Районы исследований в Японском море. 1 – зал. Петра Великого, 2 – западная часть Японского моря, 3 – северная часть Японского моря.

рий. Так, например, в Персидском заливе выявлены углеводородокисляющие виды родов *Haloferax*, *Halobacterium* и *Halococcus* (Al-Maillem et al., 2010). В Индийском океане обнаружены новые виды протеобактерий с углеводородокисляющей активностью, это *Altererythrobacter marinus* (Lai et al., 2009) и *Nitratireductor indicus* (Lai et al., 2011). К уникальным УВОМ Жёлтого моря отнесены бактерии родов *Algoriphagus*, *Aestuariaibacter*, *Celeribacter*, *Fabibacter*, *Zobellia*, *Tenacibaculum*, *Citricella*, *Roseivirga*, *Winogradskyella*, *Thioclava*, *Polaribacter* и *Pelagibaca* (Wang et al., 2014).

Информация об УВОМ дальневосточных морей в научной литературе практически отсутствует. В результате исследования микробиоты Берингова моря выявлена способность к деструкции НУ у бактерий родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Pseudobacterium*, *Achromobacter*, *Bacterium* и *Brevibacterium* (Израэль, Цыбань, 1989). Нефтеокислители Охотского моря представлены видами родов *Cobetia*, *Pseudoalteromonas*, *Oceanisphaera*, *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Marinomonas* и *Thalassospira* (Buzoleva et al., 2017).

Сведений об углеводородокисляющей микробиоте Японского моря и её участии в самоочищении экосистемы также недостаточно, несмотря на хроническое загрязнение этого региона нефтепродуктами. Публикации в основном посвящены исследованию сезонной динамики численности УВОМ в прибрежных районах с разной антропогенной нагрузкой (Бойченко и др., 2009). В ряде работ определены нефтеокисляющие свойства отдельных штаммов бактерий, выделенных из по-

верхностных вод, а также рассмотрена возможность их использования для биоремедиации (Nara et al., 2003; Chaegun et al., 2004; Голозубова и др., 2018). Японские авторы (Tanaka et al., 2008) на основе результатов молекулярно-генетических исследований прибрежных вод Японского моря высказали предположение о существенной роли цианобактерий и представителей рода *Alcanivorax* в самоочищении данного района. Таким образом, в настоящее время отсутствуют сведения о комплексных исследованиях таксономического состава и свойств УВОМ в водной толще и донных осадках Японского моря.

Цель нашей работы – изучение таксономического разнообразия культивируемых углеводородокисляющих бактерий из поверхностных вод и донных осадков Японского моря.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Характеристика районов исследования и отбор проб

Материалом для работы послужили пробы поверхностных вод и верхнего окисленного слоя донных осадков Японского моря, полученные в 2018 и 2019 гг. в ходе экспедиционных работ на НИС “Академик М.А. Лаврентьев” (рейсы № 81 и 88), а также во время береговых экспедиций. Исследования проводили на 50 станциях в трех районах: в северной части Японского моря (между $43^{\circ}25'$ и $44^{\circ}36'$ с.ш.; $136^{\circ}32'$ и $137^{\circ}51'$ в.д.), в зал. Петра Великого (между $42^{\circ}16'$ и $43^{\circ}09'$ с.ш.; $130^{\circ}56'$ и $133^{\circ}02'$ в.д.) и в западной части Японского моря (между $36^{\circ}42'$ и $42^{\circ}13'$ с.ш.; $130^{\circ}12'$ и $131^{\circ}13'$ в.д.) (рис. 1).

Все исследованные районы испытывают мощное влияние антропогенного пресса, включая загрязнение нефтью и нефтепродуктами. На большей части береговой линии зал. Петра Великого располагаются населенные пункты, промышленные и сельскохозяйственные предприятия, железная дорога. На акватории залива находятся крупные морские порты Владивосток, Находка, Большой Камень и Посыет, а также специализированный морской нефтеналивной порт Козьмино. По результатам исследований, проведенных в 2017 г., в большинстве прибрежных акваторий зал. Петра Великого отмечено увеличение численности нефтеокисляющего бактериопланктона (Доклад..., 2018).

Станции отбора проб в северной и западной частях Японского моря также находились в районах активного судоходства. Акватории в западной части моря испытывают влияние терригенных стоков крупных населенных пунктов Корейской Народно-Демократической Республики и Республики Корея. В северной части Японского моря станции отбора проб находились в зоне холодного Приморского течения. На берегу этого района отсутствуют крупные населенные пункты, однако здесь расположены предприятия по добы-

че бора, олова, свинца и других полиметаллических руд (ЗАО “Горно-химическая компания Бор”, АО “ГМК “Дальполиметалл”).

Образцы осадков получали, руководствуясь нормативными документами, а также методическими рекомендациями и требованиями к отбору проб донных отложений водных объектов для анализа на загрязненность (ПНД Ф 12.1:2.2.2.2.3:3.2–03). В зависимости от расположения станций глубина отбора проб донных осадков варьировала от 5 до 3670 м от поверхности моря. В морских экспедициях для отбора донных отложений использовали гравитационную геологическую трубку. Трубка имела утяжеленную конструкцию; длина приемной части керна составляла 4 м. В береговых экспедициях пробы брали пробоотборником из нержавеющей стали объемом 500 мл. Окисленный слой стерильно отбирали ложкой во флакон для хранения. С момента отбора проб до начала исследований образцы хранили в морозильной камере при температуре -30°C .

Для микробиологического анализа поверхностных вод с помощью батометра Паталаса с глубины 2–5 м отбирали по 1.5 л морской воды, которую пропускали через полимерные фильтры (Millipore, США) с диаметром пор 0.22 мкм. Полученные пробы использовали для дальнейших исследований.

Выделение углеводородокисляющих бактерий из проб воды и донных осадков

Для получения коллекции культур углеводородокисляющих бактерий (УВОБ) в качестве источника НУ использовали флотский мазут как один из нефтепродуктов, наиболее характерных для антропогенного загрязнения морской среды. Для создания накопительных культур УВОБ донные осадки и фильтры с биомассой помещали в минеральную среду Ворошиловой–Диановой со стерильным флотским мазутом (2.5%) в качестве единственного источника углерода (Патент РФ № 2520084). В состав минеральной среды (г/л дистиллированной воды) входили $\text{NaCl} - 10.0$, $\text{NHNO}_3 - 1.0$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 1.0$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1.0$, $\text{MgSO}_4 - 0.2$, $\text{CaCl}_2 - 0.02$ и $\text{FeCl}_2 - 2$ капли насыщенного раствора. Инкубацию проводили в течение 10 сут при температуре 22°C и 30 сут при температуре 5°C . Для получения чистых культур УВОБ их высевали на аналогичную агаризованную среду и выращивали в тех же условиях. После инкубации полученные изолированные колонии переносили на свежую среду для дальнейшей работы.

Для изучения физиологических особенностей полученных микробных штаммов проводили их инкубацию на среде Ворошиловой–Диановой с добавлением 2.5% мазута, летнего дизельного топлива или нефти марки “Vityaz” при температуре 22°C в течение 7–15 сут и при температуре 5°C в течение 15–30 сут. Отмечали способность

каждого штамма расти на среде с тем или иным субстратом при средней и низкой температуре.

Молекулярно-генетическая идентификация углеводородокисляющих бактерий и филогенетический анализ

Геномную ДНК из культур бактерий выделяли с помощью коммерческого набора “Genomic DNA purification kit” (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя. Фрагмент гена 16S рРНК амплифицировали с использованием пары праймеров 27F (5'-AGAGTTT-GATCATGGCTCAG-3') и 1350R (5'-GACGGGCG-GTGTGTACAAG-3') (Lane et al., 1985). Продукты ПЦР в электрофорезной камере разделяли в 1% агарозном геле с добавлением этидиум бромидом. Продукты амплификации нужной длины вырезали из геля и экстрагировали, замораживая при температуре -80°C (30 мин) и центрифугируя при 13.4 тыс. об/мин в течение 20 мин. Полученные ПЦР-продукты секвенировали по методу Сэнгера, используя набор 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 поиска гомологичных последовательностей в международном банке данных (GenBank) с помощью программы BLAST (Altschul et al., 1997) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Редактирование последовательностей выполнено в редакторе BioEdit; для выравнивания последовательностей использовали алгоритм программы CLUSTAL W (<http://www.genebee.msu.su/clustal>). Филогенетическое дерево построено с использованием метода ближайших соседей (neighbor-joining) на основе алгоритма Kimura two-parameters в программе MEGA 7 (Kumar et al., 2016). Показатель достоверности порядка ветвления определяли на основании bootstrap-анализа 100 альтернативных деревьев.

Нуклеотидные последовательности фрагментов гена 16S рРНК отдельных штаммов бактерий депонированы в базе данных GenBank под номерами: MT280154, MT328549–MT328554, MT328559, MT328563–MT328565, MT328567, MT328568, MT328609, MT328610, MT328615, MT328619, MT328624, MT328625, MT328631, MT328634, MT328635, MT328639, MT328736, MT328737, MT328750, MT328751, MT328759, MT328760, MT328762, MT328781, MT328782, MT328802, MT328803, MT328827, MT328828, MT328859, MT328902, MT332430, MT332431, MT332685, MT332706, MT332713, MT333204, MT333206, MT333207, MT333220, MT333236, MT333237, MT333245 и MT337509. В базу данных внесены сведения о микроорганизмах, идентифицированных нами до вида, о психротолерантных штаммах бактерий, а также о тех бактериальных штаммах, для которых углеводородокисляю-

Таблица 1. Субстратная специфичность психротолерантных штаммов бактерий, выделенных из Японского моря

| Станция отбора проб, координаты | Источник выделения штамма | Вид и название штамма (асс. № гена 16S рРНК) | Рост при температуре 5°C | | | |
|---|------------------------------|--|---|-------|-------|---|
| | | | ЛТД | мазут | нефть | |
| Зал. Петра Великого (порт Находка), 42°49' N, 132°54' E | Вода | <i>Micrococcus yunnanensis</i> NH_8-1K (MT280154) | + | + | — | |
| | | <i>Enterobacter</i> sp. NH_8-3K (MT328552) | + | + | — | |
| | | <i>Bacillus mycoides</i> NH_8-6K (MT328549) | + | + | — | |
| Зал. Петра Великого, 42°43' N, 131°59' E | Осадки, 67 м | <i>Rhodococcus</i> sp. AP_21102 (MT328750) | + | + | — | |
| | | <i>Thalassobacillus</i> sp. AP_21102-3 (MT332713) | + | + | + | |
| | | <i>Planomicrobium chinense</i> AP_21102-5 (MT332706) | + | + | + | |
| | | <i>Okibacterium</i> sp. AP_21104-1 (MT328563) | + | + | + | |
| | | <i>Bacillus subtilis</i> AP_211722-1 (MT328615) | + | + | + | |
| Зал. Петра Великого, 42°28' N, 132°34' E | Осадки, 232 м | <i>Mycolicibacterium vanbaalenii</i> AP_211823-1 (MT328635) | + | + | + | |
| | | | <i>Paenibacillus ehimensis</i> AP_211823-3 (MT328625) | + | + | + |
| Зал. Петра Великого, 42°30' N, 132°41' E | Осадки, 174 м | <i>Idiomarina piscisalsi</i> AP_212229 (MT328631) | + | + | + | |
| | | | <i>Williamsia muralis</i> LV81-1jGC_4S (MT328759) | + | + | + |
| Зал. Петра Великого, 42°39' N, 133°02' E | Осадки, 90 м | <i>Patulibacter minatonensis</i> LV81-1jGC_13S (MT328781) | + | + | — | |
| | | | <i>Bacillus thuringiensis</i> LV81-1jGC_14S (MT333237) | + | + | + |
| | | | <i>Williamsia</i> sp. LV81-01GC_5S (MT328782) | + | + | + |
| | | | <i>Micrococcus</i> sp. LV81-01GC_15S (MT328564) | + | + | + |
| Северная часть Японского моря, 43°34' N, 137°45' E | Осадки, 3617 м | <i>Bacillus thuringiensis</i> LV81-01GC_16S (MT328828) | + | + | + | |
| | | | <i>Williamsia</i> sp. LV81-01GC_5S (MT328782) | + | + | + |
| Северная часть Японского моря, 43°25' N, 137°51' E | Осадки, 3656 м | <i>Micrococcus</i> sp. LV81-01GC_15S (MT328564) | + | + | + | |
| | | | <i>Bacillus thuringiensis</i> LV81-01GC_16S (MT328828) | + | + | + |
| | | | <i>Williamsia</i> sp. LV81-01GC_5S (MT328782) | + | + | + |

Примечание. ЛТД – летнее дизельное топливо.

шая способность показана впервые в нашем исследовании.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе изучения материала, отобранного на 50 станциях в Японском море, в пробах с 42 станций обнаружены накопительные культуры УВОБ. Со всех точек отбора всего удалось выделить 137 штаммов бактерий: 49 из донных осадков и 88 из поверхностных вод.

Изучение таксономического положения полученных культур показало, что они относятся к бактериям филумов Actinobacteria, Firmicutes и Proteobacteria. Доля штаммов филума Actinobacteria, выделенных из воды, составила 55.68% (49 штаммов), из донных осадков – 59.18% (29 штаммов). Доля штаммов филума Firmicutes, выделенных из воды, составила 29.54% (26 штаммов), из донных осадков – 32.66% (16 штаммов). Proteobacteria оказались наименее представленной

группой: из воды выделено 13 штаммов (14.78%), из осадков – 4 штамма (8.16%).

Микробиота филума Actinobacteria была представлена 11 родами и 17 видами. По количеству выделенных изолятов доминировали бактерии родов *Micrococcus* (20 изолятов, отнесенных к *Micrococcus* sp., *M. luteus* и *M. yunnanensis*) и *Corynebacterium* (18 изолятов, отнесенных к *Corynebacterium* sp.). Остальные штаммы актинобактерий идентифицированы как *Mycolicibacterium vanbaalenii*, *Rhodococcus fascians*, *Rhodococcus* sp., *Williamsia muralis*, *Williamsia* sp., *Microbacterium* sp., *Okibacterium* sp., *Arthrobacter* sp., *Lechevalieria flava*, *Streptomyces* sp., *Patulibacter minatonensis* и *Patulibacter* sp.

Филум Firmicutes был представлен 10 родами и 16 видами. Чаще других из среды выделяли бактерий рода *Bacillus* (28 изолятов, отнесенных к *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. aquimaris* и *B. thuringiensis*). Остальные штаммы идентифицированы как *Gracilibacillus massiliensis*, *Psychrobacillus soli*, *Thalassobacillus* sp., *Virgibacillus dokdonensis*, *Paenibacillus ehimensis*, *P. polymyxa*, *Chry-*

seomicrobium amylolyticum, *Jeotgalibacillus marinus*, *Planococcus halocryophilus* и *Planomicrobium chinense*.

К Proteobacteria относились бактерии семи родов и 10 видов. Больше всего изолировано видов рода *Acinetobacter* (*A. johnsonii*, *A. marinus*, *Acinetobacter* sp.). Из других представителей протеобактерий обнаружены виды *Idiomarina maritima*, *I. piscisalsi*, *Enterobacter* sp., *Cobetia marina*, *Thalassolituus oleivorans*, *Moraxella osloensis* и *Pseudomonas* sp.

На следующем этапе работы изучали способность выделенных штаммов расти на средах с нефтью и нефтепродуктами (летнее дизельное топливо и флотский мазут) при температуре 22° и 5°C. В результате было показано, что при температуре 22°C на средах с данными субстратами росли все штаммы исследованных бактерий. При температуре 5°C на средах с дизельным топливом и мазутом росли 17 штаммов бактерий, а на среде с нефтью – лишь 12 штаммов (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Таксономическое разнообразие углеводородокисляющих бактерий, изолированных из воды и донных осадков Японского моря

Полученная нами коллекция представлена преимущественно грамположительной микробиотой, в то время как наиболее активные виды УВОБ из ближайшего Охотского моря были грамотрицательными (Buzoleva et al. 2017). Возможно, что микробные сообщества Японского моря в выбранных нами акваториях испытывают большее влияние терригенных стоков, чем сообщества Охотского моря. В целом углеводородокисляющая микробиота осадков характеризовалась более высоким разнообразием, чем таковая воды, что, вероятно, связано с выраженной неоднородностью физико-химических характеристик донных отложений на разных глубинах.

Анализ данных показывает, что в полученной нами коллекции культивируемых УВОБ Японского моря представлены как типичные окислители нефтеуглеводородов, так и уникальные.

Согласно литературным данным, виды обнаруженных нами родов *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus* (*Paenibacillus*), *Acinetobacter* и *Arthrobacter* довольно часто встречаются в морской среде и обладают углеводородокисляющей способностью. На основе этих микроорганизмов созданы некоторые коммерческие препараты для устранения нефтяных загрязнений (Das, Chandran, 2011). Углеводородокисляющие изоляты *Microbacterium* чаще всего выделяют из почвы, но опубликованы сведения и о морских углеводородокисляющих представителях этого таксона (Dashti et al., 2015). Таким образом, подавляющее большинство нашей коллекции относится к группе наиболее распространенных в водной и почвенной среде УВОМ.

Особого внимания заслуживают полученные нами штаммы бактерий, у которых углеводородокисляющая способность обнаружена впервые (рис. 2). Среди представителей филума Firmicutes это *Gracilibacillus massiliensis*, *Thalassobacillus* sp., *Virgibacillus dokdonensis*, *Chryseomicrobium amylolyticum* и *Jeotgalibacillus* (*Marinibacillus*) *marinus*.

У штамма *Thalassobacillus* sp. AP_21102-3 (MT332713) выявлена высокая степень родства (99.29%) с изолятами, полученными из воды (MH410548) и засоленной почвы (MH627225). Углеводородокисляющая активность бактерий этого рода пока не изучена, хотя опубликованы сведения о способности штамма *Thalassobacillus devorans* G-19.1T (AJ717299) разлагать фенол (García et al., 2005).

Ближайшим гомологом штамма *Chryseomicrobium amylolyticum* AP_213962 (MT337509) стал *C. amylolyticum* 0136 (KP236269), выделенный с морской водоросли *Thalassia hemprichii* из прибрежной зоны Китая. Разные виды *Chryseomicrobium* ранее были обнаружены также в донных отложениях Аравийского моря (Farha et al., 2018) и в воде Бенгальского залива (Aroga et al., 2011).

Интересно отметить, что нуклеотидная последовательность штамма *Jeotgalibacillus marinus* VL_204M (MT332685) имела одинаково высокий процент гомологии (99.74%) с изолятами с противоположных частей Земли: *Marinibacillus* (*Jeotgalibacillus*) *marinus* R-42990 (FR691459) получен из Антарктики, а *Marinibacillus* (*Jeotgalibacillus*) sp. NP15 (EU196342) – с Канадского Арктического архипелага.

Примечательно, что ближайшими гомологами штаммов *Virgibacillus dokdonensis* AP_215685 (MT333236) и *Gracilibacillus massiliensis* AP_214468 (MT333207) являются культуры, полученные из кишечника трепангов (Echinodermata: Holothuroidea). Известно, что по типу питания трепанги детритофаги-грунтоеды, и этим обусловлено обилие в их пищеварительном тракте почвенных микроорганизмов, особенно представителей семейства Bacillaceae (Bogatyrenko, Buzoleva, 2016). Согласно литературным данным, виды родов *Virgibacillus* и *Gracilibacillus* часто являются галофилами и характерны для экосистем почв, морей и озер (Guan et al., 2017; Zeaiter et al., 2019).

У четырех видов бактерий филума Actinobacteria *Okibacterium* sp., *Lechevalieria flava*, *Patulibacter* sp. и *Patulibacter minatonensis* способность утилизировать НУ обнаружена впервые. Анализ нуклеотидной последовательности штамма *Okibacterium* sp. AP_21104-1 (MT328563) показал одинаковый процент гомологии (98.85%) с почвенными штаммами, зарегистрированными в GenBank под номерами KJ482856 и MF872597. Чаще всего изоляты *Okibacterium* выявляют среди ассоциантов разных видов растений (Evtushenko et al., 2002; Wang et al., 2015). Нам удалось впервые выделить эти бактерии из морских донных отложений.

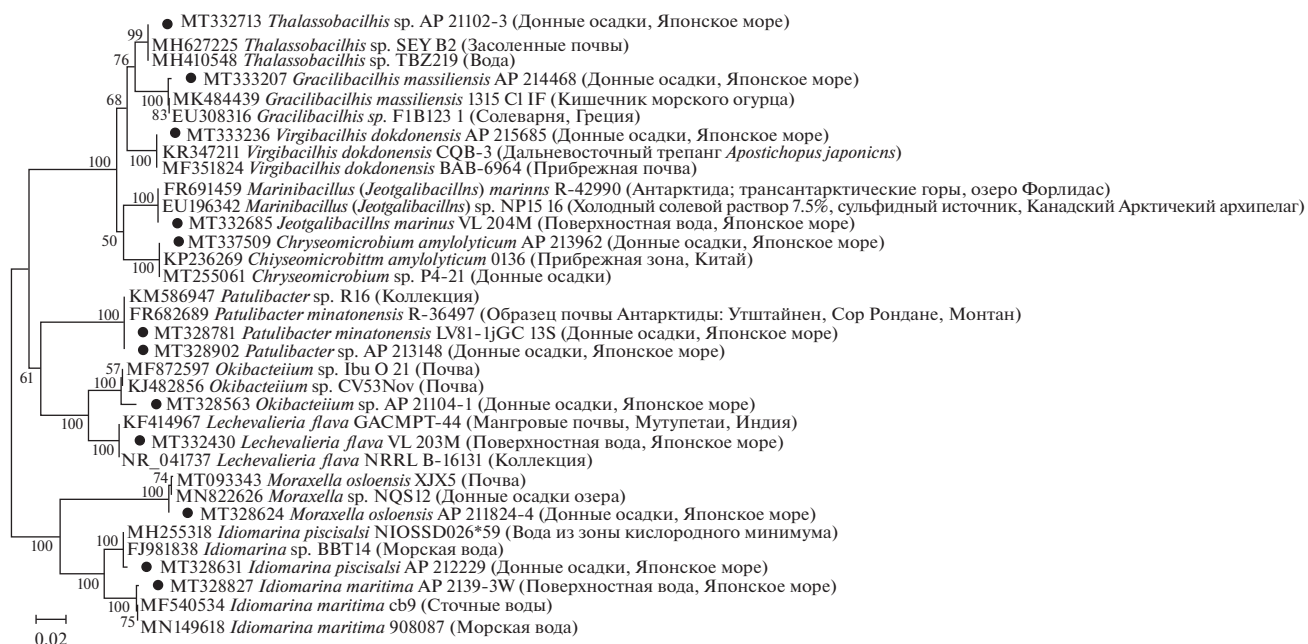


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа последовательностей фрагментов гена 16S рНК бактерий, изолированных из воды и донных осадков Японского моря, для которых углеводородокисляющая способность показана впервые. Дендрограмма построена на основе алгоритма метода объединения ближайших соседей (NJ). Последовательности, полученные в данной работе, отмечены чёрным кружком. Масштаб соответствует двум нуклеотидным заменам на каждые 100 п.н. Представлены значения бутстреп поддержки выше 50%.

Штамм *Lechevalieria flava* VL_203M (MT332430) выделен из воды бухты Золотой Рог (зал. Петра Великого). Микроорганизмы этого вида относятся к семейству Pseudonocardiaceae и в большинстве случаев выделяются из почвы. *L. flava* известен как продуцент мадумицина — антибиотика класса стрептограмминов (Gauze et al., 1974).

Бактерии рода *Patulibacter* найдены и описаны относительно недавно (Takahashi et al., 2006). Как правило, они встречаются в почве и в ризосфере некоторых растений. Сравнительный анализ показал, что обе полученные нами культуры *Patulibacter* имеют высокую степень генетического сходства друг с другом и кластеризуются с коллекционными штаммами и со штаммами, выделенными из почвы Антарктиды.

Среди представителей филума Proteobacteria, у которых впервые обнаружена углеводородокисляющая активность, оказались три вида: *Moraxella osloensis*, *Idiomarina maritima* и *I. piscisalsi*. Бактерии вида *M. osloensis* относятся к условно-патогенной микробиоте человека и способны вызывать пневмонию, менингит, синусит и ряд других инфекционных заболеваний. Нуклеотидная последовательность полученного нами штамма *M. osloensis* AP_211824-4 (MT328624) имела наибольшее сходство (99.62%) с таковой штаммов, полученных из почвы (MT093343) и донных осадков озера (MN822626). Сведения об использовании бактериями этого вида НУ в качестве единственного источника углерода расширяют знания о возможности существования условно-патогенных микроорганизмов вне организма хозяина.

Ко времени написания данной статьи к роду *Idiomarina* относили 30 видов бактерий, характерной особенностью которых является способность расти в условиях высокой солености (до 15%). В ходе нашей работы из донных осадков выделен штамм *I. piscisalsi* AP_212229 (MT328631), а из поверхностной воды — штамм *I. maritima* AP_2139-3W (MT328827). Нуклеотидные последовательности обоих штаммов имели наибольшее сходство с изолятами, полученными из морской среды.

Необходимо отметить, что большинство видов бактерий, углеводородокисляющая активность которых впервые описана в нашей работе, выделены из зал. Петра Великого вблизи урбанизированных территорий. Вероятно, в условиях хронического антропогенного загрязнения различными поллютантами формируются сообщества микроорганизмов, устойчивые к действию высоких концентраций нефтеуглеводородов.

Углеводородокисляющая активность выделенных штаммов бактерий

Все штаммы, проявившие способность к росту на среде с НУ в качестве единственного источника углерода при температуре 5°C, хорошо росли и при более высокой температуре, что указывает на их психротолерантность. Эта группа микроорганизмов демонстрирует активность при температуре 5°C или ниже независимо от их максимальной или оптимальной температуры роста. Несоответствие температурного оптимума микроорганизмов и температуры их естественной среды обитания может быть

связано с культивированием микроорганизмов в лабораторных условиях, когда невозможно воссоздать особенности морской среды в полной мере.

Отметим, что психротолерантные углеводородокисляющие штаммы бактерий выделены преимущественно из донных осадков, но с разных глубин (от 67 до 3656 м). Исключением были 3 штамма, изолированные из поверхностных вод порта Находка – акватории Японского моря с хроническим загрязнением нефтепродуктами. Психротолерантные микроорганизмы были представлены как известными УВОБ, так и видами, для которых углеводородокисляющая активность описана впервые (*Thalassobacillus* sp., *Idiomarina piscisalsi*, *Patulibacter minatonensis*, *Okibacterium* sp.).

К настоящему времени опубликованы ограниченные сведения о видовом разнообразии и углеводородокисляющей способности микроорганизмов дальневосточных морей, несмотря на то, что в регионе ведется активная добыча нефти, а многие прибрежные акватории испытывают влияние хронического техногенного загрязнения. Проведенные нами комплексные исследования таксономического разнообразия культивируемых бактерий Японского моря позволили выявить как типичные для водных и почвенных сообществ виды УВОБ, так и ряд уникальных видов. В дальнейшем коллекция бактериальных штаммов может быть использована при создании на их основе препаратов для ликвидации нефтяных загрязнений в дальневосточных морях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-00028). Образцы воды и донных осадков получены в ходе экспедиционных работ, выполненных в рамках государственного задания Тихоокеанского океанологического института ДВО РАН “Исследование состояния и изменений природной среды на основе комплексного анализа и моделирования гидрометеорологических, биогеохимических, геологических процессов и ресурсов Дальнего Востока” (FWM-2019-0006) и при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 18-05-00153, № 20-55-50005, № 20-35-70014), Комплексной программы фундаментальных исследований ДВО РАН “Дальний Восток” на 2018–2020 гг. (№ 20-ВАНТ-010, 18-1-008) и проектов ВАНТ (VAST № QTRU 02.02/20-21, QTRU.02.05/19-20).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны научному составу экспедиции рейсов № 81 и 88 НИС “Академик М.А. Лаврентьев” за совместную работу, а также благодарят капитана В.Б. Птушкина и экипаж судна за обеспечение проведенных работ. Авторы выражают благодарность ст. н. с. Лаборатории биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН А.П. Тюнину за помощь в проведении молекулярно-генетических исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алекперова А.И.* О роли нефтеокисляющих бактерий в самоочищении загрязненного нефтью Самур-Апшеронского шельфа Каспийского моря // Вестн. МГОУ. 2009. № 2. С. 6–9.
- Бойченко Т.В., Христофорова Н.К., Бузолева Л.С.* Микробная индикация прибрежных вод северной части Амурского залива // Изв. ТИНРО. 2009. Т. 158. С. 324–333.
- Голозубова Ю.С., Бузолева Л.С., Богатыренко Е.А. и др.* Нефтеокисляющие свойства бактерий рода *Micrococcus*, выделенных из бухты Находка залива Петра Великого (Японское море) // Самар. науч. вестн. 2018. Т. 7. № 2(23). С. 13–16.
- Доклад об экологической ситуации в Приморском крае в 2017 году // Приморская газета. 2018. № 75 (1569).
- Израэль Ю.А., Цыбань А.В.* Антропогенная экология океана. Л.: Гидрометеиздат. 1989. 528 с.
- Коронелли Т.В., Ильинский В.В., Янушка В.А., Красникова Т.И.* Углеводородокисляющая микрофлора акваторий Балтийского моря и Куршского залива, загрязненных при разливе мазута // Микробиология. 1987. Т. 56. № 3. С. 472–478.
- Коронелли Т.В., Дермичева С.Г., Ильинский В.В.* Видовая структура углеводородокисляющих бактериоценозов водных экосистем разных климатических зон // Микробиология. 1994. Т. 63. № 5. С. 917–923.
- Огородникова А.А.* Эколого-экономическая оценка воздействия береговых источников загрязнения на природную среду и биоресурсы залива Петра Великого. Владивосток: ТИНРО-центр. 2001. 193 с.
- Патент РФ № 2520084. 2014. Бузолева Л.С. Способ учета нефтеокисляющих бактерий в морской воде.
- 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.
- Al-Mailem D.M., Sorkhoh N.A., Al-Awadhi H. et al.* Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian Gulf // Extremophiles. 2010. V. 14. P. 321–328.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A. et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389–3402.
- Arora P.K., Chauhan A., Pant B. et al.* *Chryseomicrobium imtechense* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Planococcaceae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2011. V. 61. № 8. P. 1859–1864.
- Bogatyrenko E.A., Buzoleva L.S.* Characterization of the gut bacterial community of the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus* // Microbiology. 2016. V. 85. № 1. P. 116–123.

- 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.
- 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.
- Das N., Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview // *Biotechnol. Res. Int.* 2011. V. 2011. Art. ID 941810. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>
- Dashti N., Ali N., Eliyas M. et al. Most hydrocarbonoclastic bacteria in the total environment are diazotrophic, which highlights their value in the bioremediation of hydrocarbon contaminants // *Microbes Environ.* 2015. V. 30. № 1. P. 70–75.
- Evtushenko L.I., Dorofeeva L.V., Krausova V.I. et al. *Okibacterium fritillariae* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family *Microbacteriaceae* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002. V. 52. № 3. P. 987–993.
- Farha A.K., Tr T., Purushothaman A. et al. Phylogenetic diversity and biotechnological potentials of marine bacteria from continental slope of eastern Arabian Sea // *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2018. V. 16. № 2. P. 253–258.
- García M.T., Gallego V., Ventosa A., Mellado E. *Thalassobacillus devorans* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, phenol-degrading, Gram-positive bacterium // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005. V. 55. P. 1789–1795.
- Gauze G.F., Maksimova T.S., Ollkhovatova O.L. et al. Production of madumycin, an antibacterial antibiotic, by *Actinomadura flava* sp. nov. // *Antibiotiki*. 1974. V. 19. P. 771–775.
- Guan T.-W., Tian L., Li E.-Y. et al. *Gracilibacillus aidingensis* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from Aiding salt lake // *Arch. Microbiol.* 2017. V. 199. № 9. P. 1277–1281.
- 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.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. P. 1870–1874.
- Lai Q., Yuan J., Shao Z. *Altererythrobacter marinus* sp. nov., isolated from deep seawater // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. V. 59. № 12. P. 2973–2976.
- Lai Q., Yu Z., Yuan J., Sun F., Shao Z. *Nitratireductor indicus* sp. nov., isolated from deep-sea water // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2011. V. 61. № 2. P. 295–298.
- Lane D.J., Pace B., Olsen G.J. et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1985. V. 82. № 20. P. 6955–6959.
- Takahashi Y., Matsumoto A., Morisaki K., Ōmura S. *Patulibacter minatonensis* gen. nov., sp. nov., a novel actinobacterium isolated using an agar medium supplemented with superoxide dismutase, and proposal of *Patulibacteriaceae* fam. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006. V. 56. № 2. P. 401–406.
- 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.
- Wang H.-F., Zhang Y.-G., Li L. et al. *Okibacterium endophyticum* sp. nov., a novel endophytic actinobacterium isolated from roots of *Salsola affinis* C. A. Mey // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2015. V. 107. № 3. P. 835–843.
- Wang W., Zhong R., Shan D., Shao Z. Indigenous oil-degrading bacteria in crude oil-contaminated seawater of the Yellow sea, China // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 98. № 16. P. 7253–7269.
- Zeaiter Z., Marasco R., Booth J.M. et al. Phenomics and genomics reveal adaptation of *Virgibacillus dokdonensis* strain 21D to its origin of isolation, the seawater-brine interface of the Mediterranean Sea deep hypersaline anoxic basin discovery // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Art. ID 1304. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01304>

Taxonomic Diversity of Culturable Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria in the Sea of Japan

E. A. Bogatyrenko^a, A. V. Kim^{a, b}, T. I. Dunkai^{a, c}, A. L. Ponomareva^d, A. I. Es'kova^{a, d}, M. L. Sidorenko^{a, b}, and A. K. Okulov^d

^aFar Eastern Federal University, Vladivostok 690950, Russia

^bFederal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022, Russia

^cA.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

^dV.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

A total of 137 strains of mesophilic and psychrotolerant hydrocarbon-oxidizing bacteria have been isolated from three regions of the Sea of Japan exposed to different levels of anthropogenic pollution. The taxonomic affiliation of the culturable bacteria from surface water and bottom sediments, involved in the biodegradation of petroleum hydrocarbons in these regions, has been identified. The isolated microorganisms belong to the phyla Actinobacteria, Firmicutes, and Proteobacteria. The hydrocarbon-oxidizing ability of the bacteria *Okibacterium* sp., *Lechevalieria flava*, *Patulibacter* sp., *P. minatonensis*, *Gracilibacillus massiliensis*, *Thalassobacillus* sp., *Virgibacillus dokdonensis*, *Chryseomicrobium amylolyticum*, *Jeotgalibacillus marinus*, *Moraxella osloensis*, *Idiomarina maritima*, and *I. piscisalsi* has been recorded for the first time. The results obtained extend our knowledge about the potential of biodegradation of pollutants by members of certain taxa in the marine environment.

Keywords: biodiversity, hydrocarbon-oxidizing bacteria, oil, hydrocarbons, Sea of Japan