

03.02.00 – ОБЩАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 574.583

Статья поступила в редакцию 10.04.2018

**НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ РОДА *MICROCOCCUS*,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БУХТЫ НАХОДКА ЗАЛИВА ПЕТРА ВЕЛИКОГО (ЯПОНСКОЕ МОРЕ)**

© 2018

Голозубова Юлия Сергеевна, аспирант кафедры экологии
Бузолева Любовь Степановна, доктор биологических наук, профессор,
профессор кафедры биоразнообразия и морских биоресурсов
Богатыренко Елена Александровна, кандидат биологических наук,
доцент кафедры биоразнообразия и морских биоресурсов
Ким Александра Вячеславовна, аспирант кафедры экологии
Еськова Алена Игоревна, аспирант кафедры биоразнообразия и морских биоресурсов
Дальневосточный федеральный университет (г. Владивосток, Российская Федерация)

Аннотация. В данной статье показана нефтеокисляющая способность бактерий рода *Micrococcus*, выделенных из поверхностных вод бухты Находка залива Петра Великого Японского моря. Бактерии рода *Micrococcus* известны как наиболее активные деструкторы нефтеуглеводородов в естественных биотопах загрязненных объектов. В стерильные пенициллиновые флаконы с жидкой минеральной средой Ворошиловой – Диановой, содержащей 2,5% нефти или нефтепродуктов, вносили 10^5 клеток исследуемых бактерий. Изучение способности разлагать нефтеуглеводороды бактериями данного рода проводили с помощью гравиметрического метода в течение 30 суток. Была показана деструкция таких источников нефтеуглеводородов, как нефть, бензин, мазут и дизельное топливо. Выявлено, что бактерии рода *Micrococcus* показывают высокую нефтеокисляющую способность и разлагают 65–99,9% нефти и нефтепродуктов в течение 30 суток. Было показано, что источником нефтеуглеводородов с наибольшей способностью к утилизации данным родом бактерий являлся бензин. Деструкция данного источника нефтеуглеводородов бактериями на 15–20-е сутки составляла 99% от начальной концентрации. Наименьшая способность разложения бактериями рода *Micrococcus* была выявлена для дизельного топлива.

Ключевые слова: нефтеокисляющие бактерии; *Micrococcus* sp.; мазут; бензин; нефть; дизельное топливо; бухта Находка; антропогенное загрязнение; морские микроорганизмы; экологический мониторинг; Японское море; залив Петра Великого; гравиметрический метод; деструкция нефтеуглеводородов.

Актуальность исследований

В прибрежных акваториях залива Петра Великого вблизи крупных городов вследствие выбросов неочищенных бытовых отходов и судоходства традиционно отмечается повышенное содержание нефти и нефтепродуктов [1–3]. Одним из наиболее перспективных способов ликвидации загрязнения морей является биоремедиация, представляющая собой совокупность методов очистки окружающей среды за счет биохимической активности различных живых объектов, в том числе морских микроорганизмов и микроорганизмов нефтяных залежей [4; 5].

Экологическое значение бактерий как разрушителей углеводородов нефти в море очень велико, так как известно, что более высокоорганизованные формы организмов не могут осуществлять их полную деструкцию. В прибрежной зоне, постоянно загрязняющейся нефтью и нефтепродуктами, формируются специфические сообщества гетеротрофных микроорганизмов, которые обладают способностью окислять широкий спектр углеводородов и продуктов их трансформации [6]. В настоящее время описано 70 родов углеводородоокисляющих микроорганизмов, из них 28 родов бактерий, 30 родов мицелиальных грибов и 12 родов дрожжей [7]. Бактерии рода *Micrococcus* известны как деструкторы нефтепродуктов в естественных биотопах загрязненных объектов [8].

Бухта Находка залива Петра Великого испытывает сильное нефтяное загрязнение [9–11]. В 2016 г. в бухте Находка в 70,8% проб концентрация нефтеуглеводородов была выше предельно допустимого значения [12]. К настоящему времени большинство микробиологических исследований бухты Находка рассматривают только сезонную изменчивость ОМЧ гетеротрофных бактерий, физиолого-трофических групп, в том числе нефтеокисляющих бактерий [13; 14]. Таким образом, целью работы стало изучение нефтеокисляющих свойств бактерий рода *Micrococcus*, выделенных из бухты Находка Японского моря, утилизировать нефтеуглеводороды, такие как дизельное топливо, нефть, мазут и технический бензин.

Материал и методы исследований

Штаммы бактерий рода *Micrococcus* (Н1, Н2) были получены из проб морской воды бухты Находка залива Петра Великого (Японское море). Материалом для исследования послужили пробы поверхностных вод бухты, отобранные в августе 2015 г. (рис. 1). Пробы морской воды отбирались шприцем на глубине 15–20 см в пластиковый шприц ($V = 20$ мл) и обрабатывались в течение 3–6 часов. Посев проб воды производился методом последовательных разведений с высевом на поверхность среды Ворошиловой – Диановой с добавлением 2,5% нефти и нефтепродуктов [15; 16]. Инкубировали в течение 2 суток при комнатной температуре. Следующим этапом ра-

боты стало изучение фенотипических свойств полученных бактериальных изолятов. Морфологию клеток и колоний, подвижность, наличие споробразования, физиолого-биохимические признаки, окраску

по Граму, культуральные свойства учитывали в соответствии с классическими микробиологическими методами [17]. Идентификацию *Micrococcus* sp. проводили с помощью определителя Берджи [18].



Рисунок 1 – Карта-схема района исследования – бухта Находка Залива Петра Великого (Японское море)

Для изучения углеводородокисляющей способности штаммов *Micrococcus* sp. Н1 и Н2 клетки бактерий в концентрации 10^5 КОЕ/мл инокулировали в стерильные пенициллиновые флаконы с жидкой средой Ворошиловой – Диановой с добавлением 2,5% нефти или нефтепродуктов [15; 16]. Для получения достоверных результатов учитывали процент естественных потерь нефтеуглеводородов за счет окисления, не связанных с деятельностью микроорганизмов. В качестве контроля была использована жидкая среда Ворошиловой – Диановой с добавлением 2,5% нефти или нефтепродуктов без добавления суспензии с микроорганизмами. Все опыты повторяли трижды. Изучение способности разлагать нефтеуглеводороды проводили с помощью гравиметрического метода в течение 30 суток [19]. Статистическую обработку проводили с использованием параметрических методов. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента [20]. Об изменении численности клеток бактерий судили по изменению оптиче-

ской плотности опытных растворов. Измерения проводили при длине волны 540 нм на спектрофотометре UV-1800 SHIMADZU.

*Результаты исследований
и их обсуждение*

Бактерии рода *Micrococcus* продемонстрировали высокую нефтеокисляющую способность, разложив 65–99% нефти и нефтепродуктов через 30 суток. Было показано, что источником нефтеуглеводородов с наибольшей способностью к утилизации исследуемыми бактериями являлся бензин. Деструкция данного нефтепродукта бактериями на 30 суток составляла около 99% от начальной концентрации. Наименьшая способность разложения бактериями рода *Micrococcus* была выявлена для дизельного топлива. Скорость деструкции нефтеуглеводородов бактериями рода *Micrococcus* является штаммоспецифичной с сохранением высокой степени деструкции нефтеуглеводородов (табл. 1).

Таблица 1 – Способность штаммов *Micrococcus* sp. (Н1, Н2) к окислению дизельного топлива, нефти, бензина и мазута на 30 суток

Вид субстрата	Начальная концентрация субстрата, г/дм ³	Н1		Н2	
		Конечная концентрация нефтепродукта, г/дм ³	Степень деструкции, %	Конечная концентрация нефтепродукта, г/дм ³	Степень деструкции, %
Нефть	21,98 ± 0,01	2,36 ± 0,01	89,26	7,8 ± 0,01	65
Дизельное топливо	23,04 ± 0,02	4,68 ± 0,02	79,69	2,58 ± 0,03	88,8
Мазут	34,46 ± 0,03	2,72 ± 0,04	92,11	9,18 ± 0,02	73,3
Бензин	15,98 ± 0,01	0,14 ± 0,01	99,9	0,02 ± 0,01	99,9

Примечание. Показатели $M \pm m$; * различия статистически значимы по отношению к контролю ($p < 0,05$).

Наиболее эффективно разложение бензина происходит в первые дни их взаимодействия с микроорганизмами рода *Micrococcus*. На 15–20-е сутки бактерии разложили бензин практически полностью, а

дальнейший рост их численности обусловлен утилизацией продуктов распада нефтеуглеводородов (органических кислот, спиртов, альдегидов и т.п.) (табл. 2).

Таблица 2 – Оптическая плотность штаммов *Micrococcus* sp. (Н1, Н2) и степень деструкции бензина на различные сутки эксперимента

Сутки эксперимента	Н1		Н2	
	Оптическая плотность бактерий	Степень деструкции бензина, %	Оптическая плотность бактерий	Степень деструкции бензина, %
5 сутки	0,020 ± 0,003	98,25	0,030 ± 0,006	75,00
10 сутки	0,050 ± 0,002	98,87	0,070 ± 0,004	83,73
15 сутки	0,070 ± 0,004	98,87	0,100 ± 0,003	99,50
20 сутки	0,100 ± 0,003	99,00	0,157 ± 0,004	99,62
25 сутки	0,185 ± 0,001	99,9	0,310 ± 0,007	99,9
30 сутки	0,180 ± 0,002	99,9	0,300 ± 0,001	99,9

Примечание. Показатели $M \pm m$; * различия статистически значимы по отношению к контролю ($p < 0,05$).

Выводы

1. Способность к деградации нефтеуглеводородов бактериями рода *Micrococcus* можно выстроить по степени утилизации: бензин > мазут > нефть > дизельное топливо.

2. Скорость деградации бензина бактериями рода *Micrococcus* является штаммоспецифичной.

Список литературы:

1. Vashchenko M.A. Pollution in Peter the Great Bay, Sea of Japan, and its biological consequences // Russian Journal of Marine Biology. 2000. Vol. 26 (3). P. 155–166.

2. Наумов Ю.А. Антропогенез и экологическое состояние геосистемы прибрежно-шельфовой зоны залива Петра Великого Японского моря. Владивосток: Дальнаука, 2006. 300 с.

3. Ростов И.Д., Рудых Н.И., Ростов В.И., Воронцов А.А. Тенденции климатических и антропогенных изменений морской среды прибрежных районов России в Японском море за последние десятилетия // Известия ТИНРО. 2016. Т. 186. С. 163–181.

4. Tan N.C.G., Prenafeta-Boldu F.X., Opsteeg J.L., Lettinga G., Field J.A. Biodegradation of azo dyes in co cultures of anaerobic granular sludge with aerobic aromatic amine degrading enrichment cultures // Appl. Microbial. Biotechnol. 1999. Vol. 51. P. 865–871.

5. Миронов О.Г. Бактериальная трансформация нефтяных углеводородов в прибрежной зоне моря // Морской экологический журнал. 2002. Т. 1, № 1. С. 56–66.

6. Wackett L.P. Biodegradation of fuel components // Environ. Microbiol. 2008. Vol. 10. P. 1380–1381.

7. Иванов В.П., Сокольский А.Ф. Научные основы стратегии защиты биологических ресурсов Каспийского моря от нефтяного загрязнения. Астрахань: Изд-во КаспНИРХа, 2000. 181 с.

8. Сазыкин И.С., Сазыкина М.Л., Чистяков В.А., Кленкин А.А., Павленко Л.Ф. Утилизация углеводородов, смол и асфальтенов нефтеоокисляющими микроорганизмами керченского пролива // Вода: химия и экология. 2011. № 1. С. 29–34.

9. Смолина (Макогина) И.С., Христофорова Н.К. Оценка качества морской воды заливов Восток и Находка // Географические и геоэкологические исследования на Дальнем Востоке. Вып. 2. Владивосток, 2006. С. 141–148.

10. Галышева Ю.А. Биологические последствия органического загрязнения прибрежных морских

экосистем российской части Японского моря // Известия ТИНРО. 2009. Т. 158. С. 209–227.

11. Нигматулина Л.В., Кику Д.П., Черняев А.П. Оценка воздействия антропогенной деятельности на залив Находка (Залив Петра Великого, Японское море) // Известия ТИНРО. 2011. Т. 166. С. 219–230.

12. Доклад об экологической ситуации в Приморском крае в 2016 году // Приморская газета. 2017. № 74 (1412). С. 6–29.

13. Бузолева Л.С., Смирнова М.А., Безвербная И.П. Биологические свойства морских нефтеуглеводородоокисляющих бактерий из прибрежных акваторий дальневосточных морей с разным характером загрязнения // Известия ТИНРО. 2008. Т. 155. С. 210–218.

14. Бойченко Т.В. Химико-экологическая и микробиологическая оценка качества морских поверхностных вод Южного Приморья: дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 2009. 150 с.

15. Бузолева Л.С. Патент № 2520084 «Способ учета нефтеоокисляющих бактерий в морской воде».

16. Ворошилова А.А., Дианова Е.В. Окисляющие нефть бактерии – показатели интенсивности биологического окисления нефти в природных условиях // Микробиология. 1952. Т. XXI, вып. 4. С. 408–415.

17. Винникова О.И., Самойлов А.М., Попова Ю.В. Выделение и идентификация бактерий: методические рекомендации для студентов биологического факультета специализации «Микробиология и вирусология». Харьков: ХНУ имени В.Н. Каразина, 2011. 60 с.

18. Хоулт Дж., Криг Н., Смит П. Определитель бактерий Берджи. В 2 т.: Т. 1, Т. 2. М.: Изд-во «Мир», 1997. 800 с.

19. ПНДФ 14.1:2.116–97 Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах природных и сточных вод методом колоночной хроматографии с гравиметрическим окончанием.

20. Жижин К.С. Медицинская статистика: учебное пособие. Ростов-на-Дону: Феникс, 2007. 160 с.

Работа по изучению степени деградации нефтепродуктов бактериями выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (Соглашение № 14–50–00034). Оценка изменения численности бактерий в присутствии нефтепродуктов проведена при финансовой поддержке «Стипендии имени Гензо Шимадзу».

OIL-OXIDATION PROPERTIES OF *MICROCOCCUS* BACTERIA ISOLATED FROM THE NAKHODKA BAY SEAWATER OF THE SEA OF JAPAN

© 2018

Golozubova Julia Sergeevna, postgraduate student of Ecology Department
Buzoleva Lyubov Stepanovna, doctor of biological sciences, professor,
professor of Biodiversity and Marine Bioresources Department
Bogatyrenko Elena Aleksandrovna, candidate of biological sciences,
associate professor of Biodiversity and Marine Bioresources Department
Kim Alexandra Vyacheslavovna, postgraduate student of Ecology Department
Eskova Alena Igorevna, postgraduate student of Biodiversity and Marine Bioresources Department
Far Eastern Federal University (Vladivostok, Russian Federation)

Abstract. This paper shows the oil-oxidizing ability of *Micrococcus* bacteria isolated from the Nakhodka Bay surface waters of the Peter the Great Gulf, the Sea of Japan. *Micrococcus* Bacteria are known to be the most active destructors of petroleum hydrocarbons in natural biotopes, contaminated objects. Voroshilova-Dianova liquid containing 2,5% oil or oil products was introduced into sterile penicillin bottles with 105 cells of the investigated bacteria. The ability to destruct petroleum hydrocarbons by bacteria of this genus was studied using a gravimetric method during 30 days. Destruction of oil, gasoline, fuel oil and diesel fuel was shown. *Micrococcus* bacteria showed a high oil-oxidizing ability and decompose 65–99,9% of oil and oil products within 30 days. Gasoline was the source of petroleum hydrocarbons with the greatest ability to utilize this genus of bacteria. The destruction of this hydrocarbons source by bacteria on days 15–20 was about 99% of the initial concentration. The lowest ability of destruction by *Micrococcus* bacteria was revealed for diesel fuel.

Keywords: oil-oxidizing bacteria; *Micrococcus* sp.; fuel oil; petrol; oil; diesel fuel; Nakhodka bay; anthropogenic pollution; marine microorganisms; ecological monitoring; the Sea of Japan; the Gulf of Peter the Great; gravimetric method; destruction of petroleum hydrocarbons.

УДК 581.55

Статья поступила в редакцию 16.04.2018

ШИРОКОЛИСТВЕННЫЕ НАСАЖДЕНИЯ РАЙОНА ШИРОКОЛИСТВЕННО-ТЕМНОХВОЙНЫХ ЛЕСОВ ЮЖНОГО УРАЛА (НЕКОТОРЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ)

© 2018

Горичев Юрий Петрович, кандидат биологических наук, заместитель директора по научной работе
Юсупов Ильдар Равилевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
*Южно-Уральский государственный природный заповедник
(п. Реветь, Белорецкий район, республика Башкортостан, Российская Федерация)*
Давыдычев Александр Николаевич, кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник лаборатории лесоведения
Кулагин Алексей Юрьевич, доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией лесоведения
Уфимский институт биологии РАН (г. Уфа, Российская Федерация)

Аннотация. В статье представлены результаты исследований широколиственных насаждений в районе широколиственно-темнохвойных лесов Южного Урала. Стационарные исследования проведены на территории Южно-Уральского государственного природного заповедника, где были заложены 9 пробных лесных площадей в разных типах широколиственных насаждений. На пробных площадях проведены исследования стандартными методами, заложены почвенные разрезы, проведены микроклиматические наблюдения с использованием цифровых термометров-регистраторов «Термохрон». В результате исследований получены данные о структуре и строении характерных типов широколиственных насаждений с преобладанием дуба и клёна. Проведена классификация биогеоценозов (типов леса) и фитоценозов (типов насаждений), выделены 3 типа леса и 4 типа насаждений. Исследованные насаждения с преобладанием дуба отнесены к 2 типам коренных насаждений: дубняк снытево-разнотравный и дубняк сыртовый или остепненный, насаждения с преобладанием клёна также отнесены к 2 типам коренных насаждений: кленовник снытево-разнотравный и кленовник высокотравный. Исследованиями установлена приуроченность типов широколиственных насаждений к определенным элементам рельефа и высотным уровням. Экологический ареал широколиственных насаждений предельно сужен, вследствие чего их фитоценотический спектр сильно обеднен. Полученные материалы представляют основу для дальнейшего мониторинга лесов.

Ключевые слова: Южный Урал; район широколиственно-темнохвойных лесов; широколиственные насаждения; тип леса; тип насаждения; дубняк; кленовник; экотоп; экологический ареал; пробная площадь; древостой; класс бонитета; запас древесины; плотность подроста; эколого-ценотическая группа; Южно-Уральский заповедник.

Введение

Район широколиственно-темнохвойных лесов охватывает низкогорья западного склона Южного Ура-

ла к северу от 54 параллели, находящиеся в пределах Республики Башкортостан и Челябинской области. Горные широколиственные леса Южного Урала,