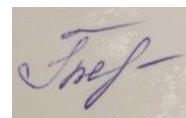


На правах рукописи



Беловежец Людмила Александровна

ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ, ПРОТЕКАЮЩИЕ ПРИ
ТРАНСФОРМАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ, И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ
ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ

03.02.08 – экология (биологические науки)

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Иркутск - 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН

Научный консультант:

Маркова Юлия Александровна,

доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии биохимии и растений Сибирского отделения Российской академии наук, заведующий лабораторией растительно-микробных взаимодействий

Официальные оппоненты:

Градова Нина Борисовна,

доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, профессор кафедры биотехнологии факультета биотехнологии и промышленной экологии

Николаев Юрий Александрович,

доктор биологических наук, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН) – обособленное подразделение Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской академии наук, заведующий лабораторией выживаемости микроорганизмов

Турковская Ольга Викторовна,

доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, заведующий лабораторией экологической биотехнологии

Ведущая организация:

Федеральный исследовательский центр "Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук" обособленное подразделение Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН

Защита диссертации состоится 12 марта 2021 года в 14:00 на заседании диссертационного совета Д 212.074.07 при ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет» по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, Байкальский музей им. проф. М.М. Кожова (ауд. 219).

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет» по адресу: 664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 124 и на сайте Иркутского государственного университета по адресу:

<http://isu.ru/ru/science/boards/dissert/dissert.html?id=181>

Отзывы просим направлять ученому секретарю диссертационного совета по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1, биолого-почвенный факультет ИГУ. Тел./факс: (3952) 24-18-55; e-mail: dissovet07@gmail.com.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук, доцент



А. А. Приставка

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Экологическая функция почвы как сложной высокоорганизованной структуры, включающей в себя минеральную (механическую) и органическую части, почвенные воздух, воду, микрофлору и микрофауну, заключается в регулировании всех потоков вещества в биосфере. При этом почвенный микробиоценоз находится в состоянии динамического равновесия, максимально эффективно функционируя в каждый конкретный момент времени. При попадании в почвенную экосистему загрязнителя (особенно это касается хронического загрязнения) нарушается ее гомеостаз, что способствует множественным и иногда необратимым изменениям, приводя к образованию «техногенных пустошей». К наиболее опасным загрязнителям относятся нефть и нефтепродукты, древесные опилки, гидролизный лигнин (ГЛ), количество которых оценивается в миллионы тонн (объемы заготовки древесины в мире оцениваются в 3.73 млрд. м³ в год, в России – 127.8 млн м³ деловой и 13.3 млн м³ дровяной древесины, а добыча нефти в 2019 году составляла около 560.2 млн т в год). Иркутская область относится к лидерам лесо- и нефтедобычи, а сложные климатические условия не позволяют эффективно нейтрализовать эти поллютанты. Экологические последствия загрязнения носят трудно учитываемый характер, поскольку нарушают многие естественные процессы и взаимосвязи, что приводит к глубокому изменению всех звеньев естественных биоценозов.

Воздействие вышеуказанных субстратов связано с изменениями как физико-химических (рН, аэрация, водопроницаемость и влагоемкость, соотношение C/N), так и биологических свойств почвы. Появление в верхних почвенных горизонтах большого количества органического углерода, а также ухудшение газообмена способствует активизации анаэробной, в том числе патогенной, микрофлоры, а выделение токсичных, чаще всего ароматических, соединений определяет общую супрессию почвенной биоты. К тому же они снижают фотосинтезирующую активность растительных организмов. Прежде всего, это сказывается на развитии

почвенных водорослей: от их частичного угнетения и замены одних групп другими до выпадения отдельных групп или полной гибели всей альгофлоры. Не меньший урон наносится растительному покрову и микрофауне. Существенным негативным фактором является также их высокая возгораемость, приводящая к длительным трудно гасимым пожарам, еще более повреждающим почву и в целом наносящим экосистеме значительный ущерб. Процесс демутиации достаточно длителен и характеризуется значительными перестройками всех членов почвенного сообщества.

Оценке степени негативного влияния на почву различных загрязнителей, а также способов ее ремедиации посвящено множество работ как в России, так и за рубежом. Наиболее перспективными, эффективными, экономичными, экологически безопасными методами являются микробные технологии, направленные на ускорение восстановления почвенного гомеостаза. Микроорганизмы, входящие в подобные препараты, способны синтезировать широкий спектр биологически активных веществ, что позволяет им взаимодействовать с почвенными микроорганизмами и растениями, целенаправленно изменяя их метаболизм, тем самым увеличивая их выживаемость в неблагоприятных экологических условиях.

Следовательно, всестороннее исследование микроорганизмов, входящих в состав микробных препаратов, позволит понять степень их экологического действия на почвенный биоценоз, а также найти пути его восстановления.

Цель диссертационной работы – установить основные закономерности эколого-биохимических процессов, протекающих при трансформации органических субстратов (нефть, лигнин, опилки), и оценить возможности их практического использования для биоремедиации почв.

Для достижения цели сформулированы следующие **задачи**:

1. Выявить путем скрининга микроорганизмы, позволяющие в короткие сроки эффективно деструктировать нефть и лигноцеллюлозные отходы, восстанавливая экологическое равновесие в загрязненных почвах.

2. Оценить эколого-биохимический потенциал исследуемых микроорганизмов при биотрансформации органических субстратов на примере индивидуальных соединений, моделирующих их фрагменты.
3. Исследовать процессы, происходящие при естественной трансформации субстратов и внесении микроорганизмов-деструкторов или их ассоциаций в условиях моделирования реального загрязнения.
4. Изучить пути взаимодействия микроорганизмов с различными компонентами почвенной экосистемы (в норме и при антропогенном загрязнении), реализующиеся через синтез и экскрецию биологически активных соединений.
5. Определить эффективность созданных консорциумов по восстановлению экологического равновесия техногенно-нарушенных почвенных экосистем, улучшению физико-химических свойств и продуктивности агроландшафта.

Научная новизна. Впервые в условиях Восточной Сибири из почв, эндо- и ризосферы растений, подвергшихся хроническому нефтяному загрязнению, выделены микроорганизмы, способные к эффективной деструкции углеводов нефти. Наиболее активные нефтедеструкторы выделены из ризосферы пырея (*Elytrigia repens*) (*Rhodococcus erythropolis*, *Acinetobacter guillouiae* штаммы 112, 114). Это свидетельствует о том, что в ризосфере данного растения отмечается селективное развитие микроорганизмов, толерантных к загрязнителю и способных к его деструкции.

Установлено, что в условиях антропогенного прессинга вносимые микроорганизмы нивелируют негативное воздействие загрязнителя на почвенный биоценоз, вступая в симбиотические взаимодействия с его различными компонентами путем синтеза внеклеточных биологически активных соединений, таких как фитогормоны, аминокислоты и сурфактанты. Обнаружено антибактериальное и фунгицидное действие исследованных микроорганизмов. Все это способствует сохранению и восстановлению растительного покрова и микробиоценоза, характерного для интактных почв.

На основании исследования деструкции ароматических соединений, входящих в состав нефти, показаны основные пути их разложения выделенными микроорганизмами. Для *Acinetobacter guillouiae* впервые выявлены штаммовые различия по способности утилизировать индивидуальные, в том числе, конденсированные соединения. Это может быть связано как с горизонтальным переносом плазмидных генов и экологической пластичностью микроорганизмов, так и с начинающимся расхождением видов. Для культур грибов установлена корреляция между скоростью разложения соединений, моделирующих структурные единицы лигнина, и наличием заместителя в фенольной гидроксильной группе.

В рамках комплексного исследования процессов, происходящих при трансформации всех изученных органических субстратов, выявлены общие закономерности, заключающиеся в интенсификации ферментативных процессов, сопровождающихся ускорением деструкции субстратов, и оценен вклад в эти процессы вносимых микроорганизмов.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость работы заключается в том, что установлены закономерности эколого-биохимических процессов, протекающих при трансформации органических субстратов, заключающиеся в резком увеличении активности оксидоредуктазных ферментов, численности микроорганизмов различных таксономических групп и в изменениях агрохимических свойств субстратов. Все это существенно сокращает время трансформации субстрата, приводя к образованию экологически безопасного продукта.

Показано, что микроорганизмы, являющиеся высокоактивными деструкторами, вступают в сложные взаимодействия с компонентами экосистемы, оказывая влияние не только с помощью ферментов, разрушающих поллютант, но и синтезируя большое количество биологически активных веществ, таких как фитогормоны, сурфактанты и антибиотикоподобные соединения, что

способствует сохранению экосистемы за счет лучшей выживаемости всех ее видов в условиях антропогенного загрязнения.

Практическая значимость диссертации заключается в том, что на основе консорциума автохтонных микроорганизмов, выделенных из ризосферы пырея, разработан и запатентован микробный препарат для биоремедиации нефтезагрязненной почвы. Его эффективность доказана в условиях модельного загрязнения. Препарат эффективен при высоком (до 20 %) содержании нефти в почве, свежем нефтяном загрязнении и низких положительных температурах, что позволит использовать его в условиях Сибирского региона на свежих проливах нефти или при хроническом загрязнении.

Установлено, что выделенный из ризосферы пырея нефтедеструктор, относящийся к роду *Rhodococcus*, способен устанавливать растительно-микробные симбиотические связи, синтезируя различные биоПАВ. При подобном взаимодействии у растений, находящихся в стрессовых условиях нефтезагрязнения, нивелируется негативный эффект загрязнителя за счет эмульгирования нефтяной пленки на корнях растения и химического разрушения нефти, а синтез фитогормонов и антибиотикоподобных соединений дает дополнительный импульс к восстановлению растительного покрова в зонах нефтезагрязнения.

Среди выделенных из свежего гидролизного лигнина «пионерных» микроорганизмов выявлены наиболее эффективные, введение которых в существующую микробную композицию для компостирования лигнина позволяет улучшить качество готового продукта.

На основе музейных штаммов создана ассоциация микроорганизмов, включающая дереворазрушающие грибы родов *Trametes*, *Sporotrichum*, *Acremonium*, *Phanerochaete*, как биопрепарат для эффективной трансформации древесных опилок с образованием высококачественного органического удобрения.

Показана эффективность созданных микробных ассоциаций при трансформации лигноцеллюлозных субстратов в органо-минеральное удобрение.

Готовый продукт улучшает физико-химические свойства и продуктивность агроландшафта. Отсутствие семян сорных растений и патогенов исключает контаминацию сельскохозяйственных почв. Разработанный способ микробной переработки древесных опилок в комплексное органико-минеральное удобрение защищено патентом РФ.

Полученные результаты являются научной базой для разработки рекомендаций по биоремедиации почвы, загрязненной нефтью. Полученные экспериментальные данные рекомендуются к использованию природоохранными органами для ликвидации свежего или хронического нефтяного загрязнения, отходов гидролизного лигнина и древесных опилок.

Материал диссертационной работы может использоваться при разработке учебных пособий, справочников, издании атласов, в учебном процессе при преподавании экологических дисциплин: безопасность жизнедеятельности, промышленная экология, прикладная эколобиотехнология и др.

Положения, выносимые на защиту:

1. Введение высокоактивных микроорганизмов значительно сокращает период токсичности трансформируемого субстрата за счет эффективной работы оксидоредуктазных ферментов и накопления пула соединений, доступных для почвенной биоты. Это создает благоприятные условия для возрастания количества кодеструкторов, что выражается в увеличении численности целлюлозолитических, нитрифицирующих и других микроорганизмов. В результате ускоряются процессы экологической демуляции, что способствует более быстрому восстановлению нарушенных почв (до 3-4 месяцев).
2. Влияние микроорганизмов, входящих в состав консорциумов, определяется синергическим эффектом прямого воздействия микробных ферментов на поллютанты и установления дополнительных биотических связей между микро- и макроорганизмами, опосредованных биологически активными соединениями.

3. Созданные ассоциации микроорганизмов способны эффективно трансформировать исследованные субстраты с получением экологически безопасных целевых продуктов.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов работы подтверждается достаточным количеством экспериментов с использованием современных методов исследования, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, подкреплены корректными экспериментальными данными, наглядно представленными в приведенных таблицах и рисунках. Подготовка и интерпретация полученных результатов проведены современными методами обработки данных, статистическая обработка данных выполнена на базе R 3.6.2.

Материалы диссертации были представлены на: Всеросс. научно-практической конференции с междунар. участием «Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии» (Иркутск, 2015), IX Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2015), VIII Всеросс. с междунар. участием конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2015» (Новосибирск, 2015), VIII Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015), Всеросс. научной конференции с междунар. участием «Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде» (Иркутск, 2016), IX Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2017), Международном юбилейном конгрессе, посвященном 60-летию Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН «Фаворский—2017» (Иркутск, 2017), Всеросс. научной конференции с международным участием «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды» (Иркутск, 2018), Международной научной конференции PLAMIC-2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология

будущего» (Уфа, 2018), X Международном симпозиуме «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2018), X Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2019), Всеросс. научной конференции с международным участием «Механизмы адаптации бактерий к различным условиям среды обитания» (Иркутск, 2019), Международной конференции «Агробизнес, экологический инжиниринг и биотехнологии» - «Conference on Agribusiness, Environmental Engineering and Biotechnologies» (AGRITECH-2019) (п. Листвянка, 2019), Международной научной конференции «Энерго-ресурсоэффективность в интересах устойчивого развития» (Красноярск, 2019), 2-м Российском Микробиологическом Конгрессе (Саранск, 2019), IX Съезде общества физиологов растений России (Казань, 2019), VII Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (Севастополь, 2019).

Публикации. Материалы диссертационной работы обобщены в 62 печатных работах, включая 22 экспериментальные статьи (в том числе индексируемых в базе WoS/Scopus – 13), 1 обзор, 37 статей в материалах конференций и 2 патента на изобретение РФ.

Личный вклад автора. В диссертации изложены результаты исследований, выполненных автором лично или при его непосредственном участии. Личный вклад автора в работы, выполненные в соавторстве и включенные в диссертацию, состоит в формулировании проблемы, постановке целей и задач проведенных исследований, планировании экспериментов, руководстве их выполнением, получении экспериментальных данных, интерпретации, анализе и обобщении полученных результатов, подготовке научных публикаций по результатам выполненной работы. Автор являлся научным консультантом кандидатской диссертации. Фамилии соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Результаты научных исследований соответствуют пп. 2, 3, 4, 7 паспорта специальности 03.02.08 Экология.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 279 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (объекты и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение), выводов, списка литературы, включающего 484 источника, из них 196 иностранных. Работа иллюстрирована 44 таблицами и 48 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы исследований, изложены цели и задачи работы, показана научная новизна и практическая значимость проводимых исследований; сформулированы положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен обзор литературы, характеризующий микробные сообщества, формирующиеся при антропогенном загрязнении. Рассмотрены эколого-биохимические особенности микроорганизмов-деструкторов, а также процессы, происходящие при трансформации субстратов. Показаны возможности использования микробных препаратов для восстановления экологического равновесия техногенно-нарушенных почвенных экосистем, улучшению физико-химических свойств и продуктивности агроландшафта. Анализ публикаций обосновывает цель настоящего исследования.

Вторая глава посвящена объектам и методам исследования. Объектами исследования были: микроорганизмы, выделенные из почвы, эндо- и ризосферы растений, отобранные на нефтезагрязненной территории Иркутского региона (п. Тыреть), гидролизный лигнин, взятый сразу после стадии гидролиза древесины (Зиминский гидролизный завод), смесь опилок различных пород древесины. В состав компостных заквасок входили *Trichosporon cutaneum (beigelii)* D-46, *T. cutaneum* 5, *Streptomyces asterosporus* (Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск), *Penicillium citreo-viride*, *Acremonium* sp., *Phanerochaete chrysosporium* Burds. 1 MR-1 (Институт водных и экологических проблем ДВО РАН, г. Хабаровск), *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Pilat (НИИ биологии при ИГУ, г. Иркутск), *Phanerochaete chrysosporium* Burds. ATCC-24725 (ВНПО Гидролизпром, г. Санкт-

Петербург), *Sporotrichum pulverulentum* (конидиальная стадия *P. chrysosporium*) Novobr. 1766 и 1767 (ВКМ, г. Пущино). При компостировании на 1 т субстрата вносили 8 кг нитроаммофоски (N/P/K 17/17/15), 8 кг мочевины и 5 кг гашеной извести или доломитовой муки.

Культуры выращивали на жидких средах - *T. cutaneum* - на среде для дрожжеподобных грибов, *S. asterosporus* - на среде для лигнинолитических актиномицетов, *P. chrysosporium*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Trametes versicolor*, *P. citreo-viride*, *Acremonium* sp. - на среде Кирка для грибов. Нефтеокисляющие микроорганизмы выращивали на жидкой минеральной среде 8E, содержащей (г/л): NH_4NO_3 - 1.0; MgCl_2 - 0.1; KH_2PO_4 - 3.0; K_2HPO_4 - 7.0; CaCO_3 - 1.0; pH 7.0, с добавлением 2 % сырой нефти. Через 2 мес. культивирования определяли убыль нефти гравиметрическим методом.

Молекулярно-генетическая идентификация выделенных штаммов бактерий выполнена на основании ПЦР-амплификации и секвенирования гена 16S рРНК с использованием стандартных методов молекулярной биологии (полимеразная цепная реакция, выделение фрагментов ДНК из агарозного геля, определение и анализ нуклеотидных последовательностей). Секвенирование выполняли в институте Микробиологии НАН Беларуси в г. Минске.

Новые штаммы микроорганизмов выделяли из ГЛ (контрольный опыт по компостированию). Все они тестировались на способность разлагать модельные соединения лигнина, в качестве которых использовали ванилин, пирокатехин, ванилиновый спирт, гваяцилпропанол-1, вератровый спирт, сиреневую кислоту. Состав метаболитов анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Милихром-1 (Россия) на колонке, заполненной сорбентом Сепарон C_{18} . В качестве элюента использовали 40 %-ный раствор метанола в 0.01M KH_2PO_4 , подкисленном H_3PO_4 до pH 3.9. Детектирование осуществляли при λ 280 нм. Состав смеси низкомолекулярных фенольных соединений при разложении нефти микроорганизмами определяли в этилацетатных экстрактах, полученных из культуральных жидкостей. Продукты

деструкции нефти идентифицировали на жидкостном микроколоночном хроматографе “Миличром А-02” (“ЭкоНова”, Россия) на колонке (2 × 75 мм, 5 μm) ProntoSil 120-5-C18 в обращенной фазе. В качестве модельных соединений нефти использовали нафталин, фенантрен и антрацен. ВЭЖХ-анализ фенольных соединений проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1260 (“Agilent Technologies Inc.”, США) на колонке Zorbax SB-C18 (5 μm, 4.6 × 250 mm), с предколонкой Zorbax SB-C18 (5 μm, 4.6 × 12,5 mm). Элюент - ацетонитрил / 2%-ная уксусная кислота (25/75), скорость подачи 1,3 мл/мин, объем петли 20 μL.

Численность микроорганизмов и активность ферментов определяли по стандартным методикам. Фитотоксичность проверяли на семенах редиса (сорт Дуро краснодарское), пшеницы (сорт Гром), гороха (сорт Сахарный стручок). Всхожесть семян рассчитывали как отношение числа проросших семян к общему числу семян. Для изучения влияния на растения эндо- и ризосферных микроорганизмов использовались семена редьки масличной *Raphanus sativus* convar. *oleiferus* (L.) Sazonova & Stank. (селекционный образец СИФИБР СО РАН «Линия ИрГСХА»). Эмиссию углекислого газа фиксировали по количеству CO₂, выделившегося из почвы за определенный промежуток времени.

Гиббереллиноподобную активность устанавливали по удлинению гипокотилей салата и эндоспермальному тесту на беззародышевых половинках семян ячменя. Для стимуляции образования ауксинов культурами в соответствующую питательную среду добавляли 200 мг/л *D,L*-триптофана. Количество ауксинов определяли по методу Сальковского, а их активность - по подавлению прорастания семян горчицы сарепской и по интенсивности укоренения черенков фасоли. Образование микроорганизмами биосурфактантов фиксировали косвенными методами: по снижению поверхностного натяжения, показателю гидрофобности, проявлению эмульгирующей активности культур. ИК спектры соединений в тонком слое получены на спектрометре FT IR Varian 3100. Статистическая обработка данных выполнена на базе R 3.6.2.

Полевые опыты проводили на светло-серых лесных почвах учебно-производственного участка Иркутской государственной сельскохозяйственной академии (п. Молодежный) в 1999-2001 гг. для компостов на основе ГЛ, в 2009-2018 гг. – на основе древесных опилок.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1 Скрининг культур микроорганизмов, способных восстанавливать экологическое равновесие при антропогенном загрязнении

Экологические функции почвы во многом определяются функционирующим в ней микробоценозом. При попадании в почвенную экосистему загрязнителя (особенно это касается хронического загрязнения) нарушается ее гомеостаз, нарушаются многие естественные процессы и взаимосвязи, что приводит к глубокому изменению всех звеньев естественных биоценозов, а выделение токсичных, чаще всего ароматических, соединений определяет общую супрессию почвенной биоты. Процесс демуляции достаточно длителен и характеризуется значительными перестройками всех членов почвенного сообщества. Одним из наиболее экологически и экономически выгодных методов для восстановления техногенно нарушенных экосистем признается применение микробных ассоциаций, подбор микроорганизмов в которых осуществляется, как правило, тремя вариантами: выращивание микроорганизмов на питательной среде с субстратом в виде единственного источника углерода и энергии, рост собственно на субстрате и/или использование для скрининга модельных соединений.

Для скрининга нефтеокисляющих микроорганизмов из эндо- и ризосферы растений и почвы было выделено 60 культур, исследованных по способности утилизировать 2 % (об.) сырой нефти в жидкой минеральной среде в виде единственного источника углерода. Для дальнейших исследований были взяты 6 наиболее активных в отношении углеводородов нефти штаммов микроорганизмов (убыль нефти более 40 %). Интересно, что большая часть выделенных культур была ассоциирована с ризосферой пырея (таблица 1). Показано, что они способны эффективно функционировать в составе композиции, разлагая высокие (до 20 %) и

экстремально высокие (50 %) концентрации нефти в среде даже при низких положительных температурах (4-10 °С). Наиболее перспективные микроорганизмы были идентифицированы молекулярно-генетическими методами с помощью анализа 16S рРНК.

Таблица 1 Источник выделения, молекулярно-генетическая идентификация выделенных штаммов и степень нефтеструкции (2 % нефти)

Штамм	Источник выделения	Идентифицированный вид	Убыль нефти, %
102	Ризосфера осоки (<i>Carex hancockiana maxim</i>)	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	40±0.7
90	Эндосфера осоки (<i>Carex acuta</i>)	<i>Pseudomonas corrugate</i>	45±0.9
109	Ризосфера пырея (<i>Elytrigia repens</i>)	<i>Pseudomonas</i> sp.	45±1.4
112	Ризосфера пырея (<i>Elytrigia repens</i>)	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	54±0.8
114	Ризосфера пырея (<i>Elytrigia repens</i>)	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	48±0.7
108	Ризосфера пырея (<i>Elytrigia repens</i>)	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	52±1.2

Для *Rhodococcus erythropolis* 108 и *Acinetobacter guillouiae* 112 исследовали деструкцию индивидуальных соединений нефти (нафталин, фенантрен и антрацен). Показано, что деградация нафталина штаммами *R. erythropolis* 108 и *A. guillouiae* 112 осуществляется по-разному (рисунок 1А, 1Б, таблица 2). Для *R. erythropolis* 108 деградация протекает ступенчато, причем есть 2 пути ее осуществления:

1. С образованием гентизиновой кислоты через 1,2-дигидрокси-нафталин, салициловый альдегид и салициловую кислоту.
2. С последовательным образованием 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты, 2-карбоксібензальдегида, *o*-фталевой и протокатеховой кислоты.

A. guillouiae 112 также способен окислять нафталин двумя метаболическими путями, однако, он не обладает ферментами для дальнейшего окисления протокатеховой кислоты, которая накапливается в среде культивирования.

В тоже время на ВЭЖ-хроматограммах не диагностируются пики салициловой кислоты, что свидетельствует о ее быстрой трансформации в другие

интермедиаты. Интересно, что среди промежуточных соединений разложения нафталина отсутствует пирокатехин.

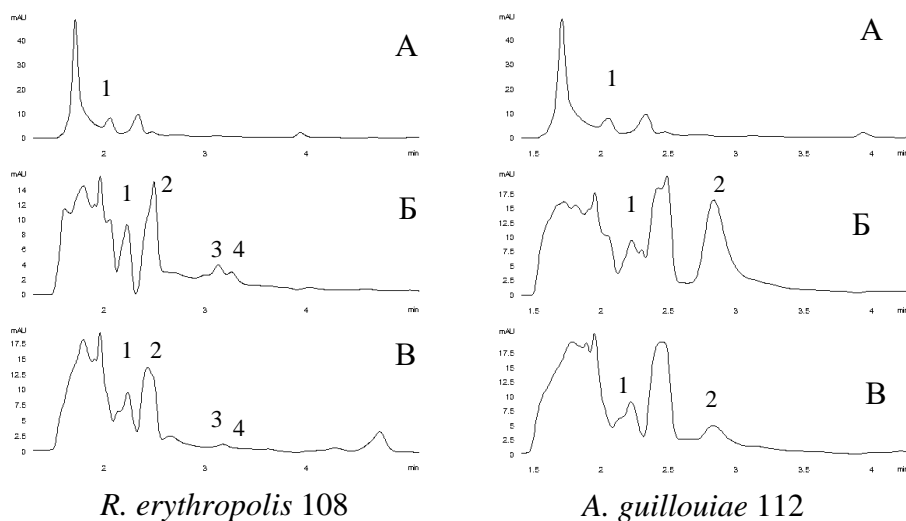


Рисунок 1 - Деструкция нафталина. А – исходное содержание, Б – 3 сут. культивирования, В – 6 сут. культивирования.

1 – нафталин, 2 – протокатеховая кислота, 3 – фталевая кислота, 4 – гентизиновая кислота; По оси абсцисс – время выхода соединений, мин.; по оси ординат – интенсивность поглощения в условных единицах (отн. ед.).

Таблица 2 - Содержание интермедиатов деградации нафталина, мг/мл

		0 сут.	3 сут.	6 сут.
<i>Rhodococcus erythropolis</i> 108	нафталин	319.7	70.7	36.1
	протокатеховая кислота	0	137.9	95.8
	о-фталевая кислота	0	2.7	0
	гентизиновая кислота	0	8.5	0
<i>Acinetobacter guillouiae</i> 112	нафталин	319.7	0	0
	протокатеховая кислота	0	136.1	150.2
	фталевая кислота	0	0	0
	гентизиновая кислота	0	0	0

Деградация фенантрена также осуществляется по двум метаболическим путям (рисунок 2А, 2Б, таблица 3):

1. С образованием гентизиновой кислоты в результате последовательного окисления фенантрена до 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты, затем до 1,2-дигидроксинафталина, салицилового альдегида и салициловой кислоты.
2. С образованием *о*-фталевой и протокатеховой кислот как интермедиатов в результате окисления фенантрена до 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты и 2-карбокисбензальдегида.

Протокатеховая кислота подвергается дальнейшей трансформации через механизм *орто*- или *мета*-расщепления. Гентизиновая кислота, в свою очередь, метаболизируется до интермедиатов цикла Кребса.

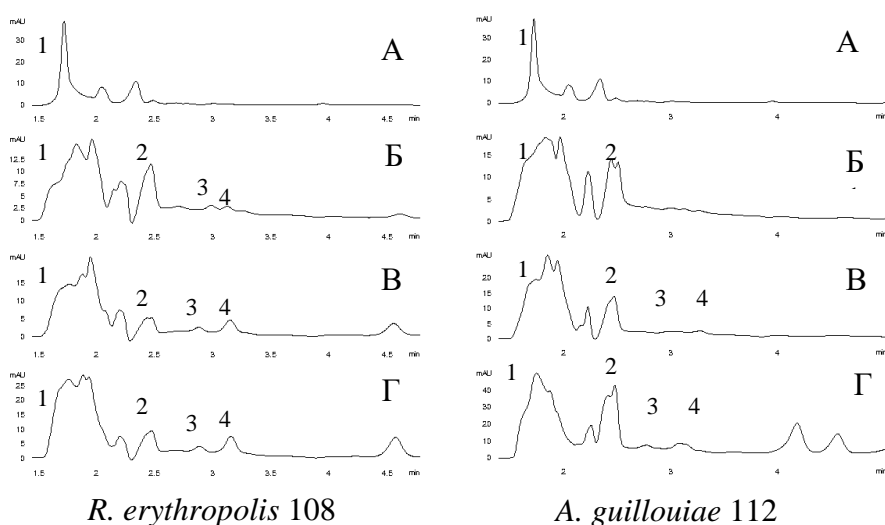


Рисунок 2 - Деструкция фенантрена. А – исходное содержание, Б – 3 сут. культивирования, В – 6 сут. культивирования, Г – 9 сут. культивирования
1 – фенантрен, 2 – протокатеховая кислота, 3 – фталевая кислота, 4 – гентизиновая кислота; По оси абсцисс – время выхода соединений, мин.; по оси ординат - интенсивность поглощения в условных единицах (отн. ед.).

По данным ВЭЖХ анализа трудно оценить количественно и описать качественно продукты окисления антрацена, поскольку видимые изменения отсутствуют на протяжении всего эксперимента. Однако в результате развертки с помощью программного обеспечения ВЭЖХ-диаграмм удалось выявить пики, свидетельствующие о присутствии в культуральной среде протокатеховой и гентизиновой кислот, причем примерно в равных количествах. Это можно

объяснить сложностью химической структуры антрацена, затрудняющей его бактериальную атаку и ферментативный метаболизм.

Таблица 3 - Содержание интермедиатов деградации фенантрена, мг/мл

		0 сут.	3 сут.	6 сут.	9 сут.
<i>Rhodococcus erythropolis</i> 108	фенантрен	225.4	136.7	60.3	37.6
	протокатеховая кислота	0	81.7	26.5	3.9
	о-фталевая кислота	0	60.5	31.5	4.3
	гентизиновая кислота	0	87.7	44.2	6.4
<i>Acinetobacter guillouiae</i> 112	фенантрен	225.4	60.2	71.3	60.8
	протокатеховая кислота	0	122.7	128.9	302.1
	фталевая кислота	0	3.6	4.1	50.9
	гентизиновая кислота	0	2.6	9.6	61.3

Разложение модельных соединений дает, конечно, некоторое представление об эффективности микроорганизма при деструкции сложного субстрата. Однако не всегда штаммы, эффективно разрушающие модели, столь же активны для самого субстрата. Поэтому была исследована деструкция ароматических компонентов сырой нефти. В связи со сложностью и многокомпонентностью исходного субстрата, детектировались низкомолекулярные фенольные соединения, являющиеся базовыми интермедиатами деградации полиароматических углеводородов (ПАУ). В результате исследований были установлены основные метаболиты, образующиеся при разложении ПАУ штаммами 90, 102, 108, 109, 112 и 114. Показано, что для каждого штамма характерен основной путь деструкции ароматических соединений с образованием салициловой кислоты и пирокатехина. Штаммы 112 и 114, относящиеся к виду *Acinetobacter guillouiae*, образовывали продукты, свидетельствующие о различных путях деструкции ими ароматических соединений. Так, в культуральной жидкости

A. guillouiae 112 детектировались салициловая и протокатеховая кислоты, что свидетельствует о наличии для данного штамма двух независимых путей разложения ПАУ. Для *A. guillouiae* 114 путь разложения был только один - с образованием пирокатехина, как производного салициловой кислоты. Это может быть связано как с горизонтальным переносом плазмидных генов и экологической пластичностью микроорганизмов, так и с начинающимся расхождением видов. Присутствие среди интермедиатов коричной, *n*-кумаровой, *n*-оксибензойной, ванилиновой, сиреневой, пирокатеховой и гентиизиновой кислот свидетельствует о способности оксигеназ изученных бактерий метаболизировать и более простые фенольные компоненты нефти. Наибольшее разнообразие интермедиатов (30 пиков) было зафиксировано для *R. erythropolis* 108 на восьмой неделе культивирования (рисунок 3). Штаммы 90, 102, 109, идентифицированные как различные виды *Pseudomonas*, по результатам данного эксперимента можно скорее отнести к содеструкторам нефти.

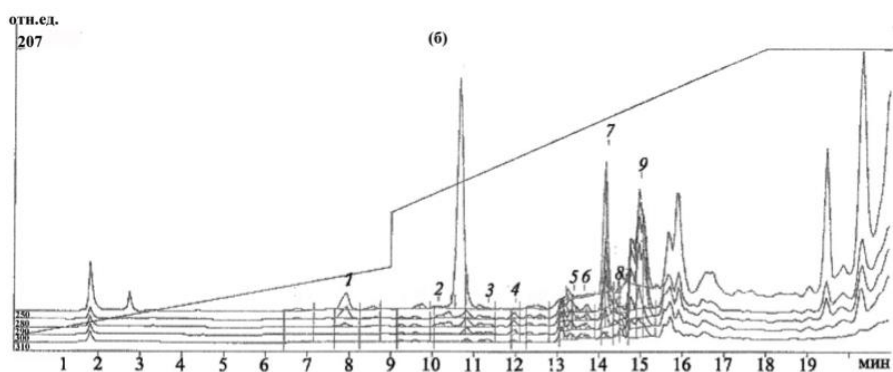


Рисунок 3 - ВЭЖ-хроматограммы для экстрактов штамма 108, полученных на 8 неделе наблюдений. 1- протокатеховая кислота; 2 - сиреневая кислота; 3 - *n*-кумаровая кислота; 4 - феруловая кислота; 5 - бензойная кислота; 6 - салициловая кислота; 7 - коричный спирт; 8 - коричная кислота; 9 - коричный альдегид. По оси абсцисс – время выхода соединений, мин.; по оси ординат - интенсивность поглощения в условных единицах (отн. ед.).

Наряду с бактериальными культурами, выделенными из ризосферы растений, способностью разлагать нефть обладают также грибы. Из 14 исследованных макро- и микромицетов, представленных в коллекции микроорганизмов ИрИХ СО РАН, лишь шесть были способны расти на нефтезагрязненном субстрате

(древесных опилках) и разлагать нефть (таблица 4). Наиболее высокие результаты (убыль более 45 % нефти) получены для штаммов, проявляющих максимальную дереворазрушающую активность. Вероятно, это связано с ко-метаболизмом древесины и нефти в данном эксперименте. В обоих случаях синтезируются внеклеточные оксидо-редуктазные ферменты, разрушающие как структурные единицы лигнина, так и ароматические соединения нефти.

Таблица 4 - Убыль нефти при культивировании грибов

Название микроорганизма	Убыль нефти, %
<i>Trametes versicolor</i> 2	50
<i>Sporotrichum pulverulentum</i> 1766	45
<i>S. pulverulentum</i> 1767	42
<i>Trichaptum laricinum</i> 6	31
<i>Fomitopsis pinicola</i> 0140	21
<i>F. officinalis</i> 1126	20

Тест на совместимость *Trametes versicolor* 2, *Sporotrichum pulverulentum* 1766 и *S. pulverulentum* 1767 с выделенными бактериями-нефтедеструкторами показал полное отсутствие подавления роста всех культур. Это дает возможность использования синергического эффекта бактериальных и грибных культур для нормализации экологического состояния нефтезагрязненных почв.

Для модификации ранее созданной ассоциации, участвующей в переработке ГЛ, из самопроизвольно трансформирующегося субстрата выделено 46 штаммов микроорганизмов. По скорости роста на минеральной питательной среде с ГЛ в виде единственного источника углерода выбраны 8 наиболее активных культур, отнесенных к двум видам: *Penicillium cyclopium* (2 штамма) и *Trichoderma asperellum* (6 штаммов). Исследована ферментативная активность выбранных штаммов и их способность трансформировать модельные соединения лигнина. Все выделенные микроорганизмы разлагают соединения со свободной фенольной гидроксильной группой (ванилин, пирокатехин, ванилиновый спирт, гваяцилпропанол-1). Максимальная скорость утилизации модельных соединений наблюдалась на 3-5 сут. с полным их исчезновением на 8-24 сут. в зависимости от

культуры. Вератровый спирт (модель с замещенной фенольной гидроксильной группой) подвергался трансформации со значительно меньшей скоростью (рисунок 4).

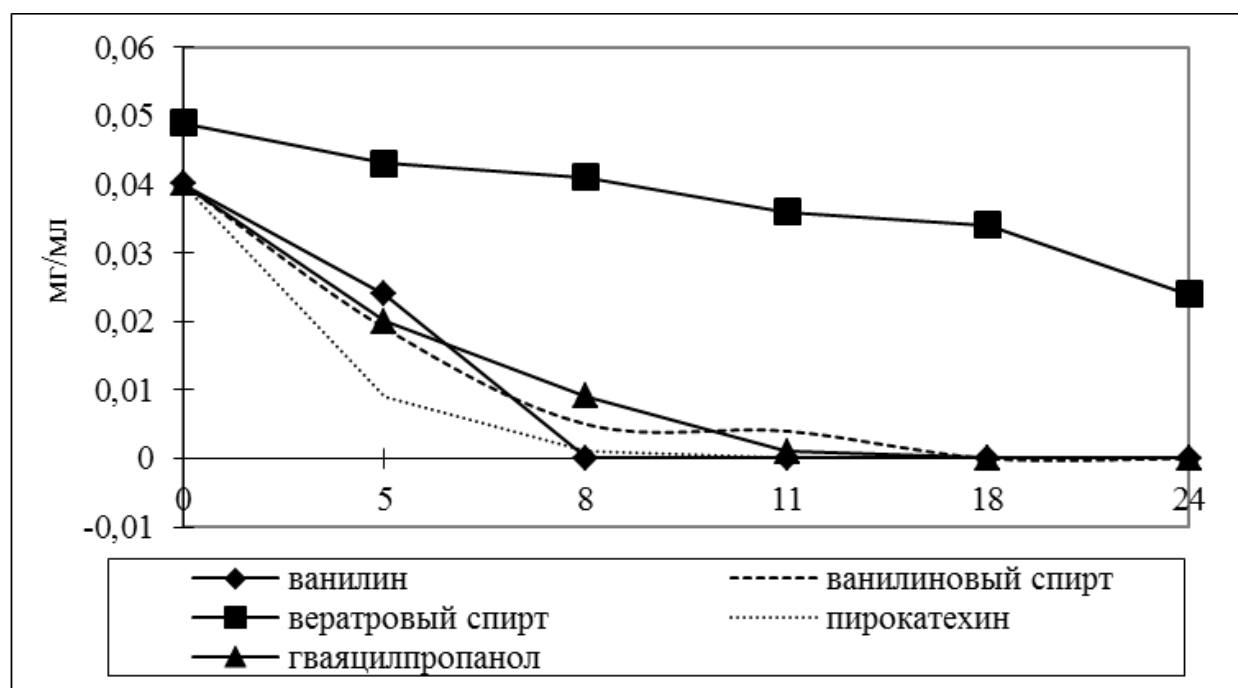


Рисунок 4 - Содержание в культуральной жидкости *Trichoderma asperellum* 8 соединений: ванилина (1); ванилинового спирта (2); вератрового спирта (3); пирокатехина (4); гваяцилпропанола-1 (5).

Среди оксидоредуктаз обнаружена только Mn-зависимая пероксидаза. По динамике Mn-пероксидазной активности все штаммы были разделены на две группы. Микроорганизмы первой группы (*T. asperellum* 4, *T. asperellum* 7, *T. asperellum* 10, *T. asperellum* 11, *P. cyclopium* 6, *P. cyclopium* 9) характеризуются двумя четкими максимумами активности: на 5-7 и 13-15 сут. культивирования. Первый максимум соответствует началу фазы экспоненциального роста, а второй – фазы споруляции. Вторая группа (*T. asperellum* 3, *T. asperellum* 8) обладает тремя максимумами активности: 8, 13-14, 18 сут. Наибольшую суммарную Mn-пероксидазную активность проявляют штаммы *T. asperellum* 8, *T. asperellum* 10 и *T. asperellum* 11.

По совокупности данных (скорость утилизации фенольных субстратов, активность Mn-зависимой пероксидазы и совместимость с микроорганизмами ранее созданной закваски) оптимальной была признана культура *T. asperellum* 3.

Лабораторное компостирование ГЛ, проведенное ассоциацией, модифицированной *T. asperellum* 3, показало, что полученный компост характеризуется увеличением количества гуминовых кислот (до 15.5 %) и пониженным содержанием лигнина – до 31 % против 38 % при использовании стандартной композиции.

Для микробной деградации древесных опилок использовали ряд музейных культур ИрИХ СО РАН. В результате первичного скрининга выбраны 7 культур дереворазрушающих грибов: *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 и 1 MR-1, *Sporotrichum pulverulentum* 1766 и 1767, *Fomitopsis officinalis* и *Acremonium* sp. Исходя из совместимости микроорганизмов, были составлены 4 различных варианта ассоциации.

1. *Trametes versicolor*, *Sporotrichum pulverulentum* 1767, *Phanerochaete chrysosporium* 1 MR-1, *Acremonium* sp.

2. *Trametes versicolor*, *Sporotrichum pulverulentum* 1766, *S. pulverulentum* 1767, *Phanerochaete chrysosporium* 1 MR-1, *Acremonium* sp.

3. *Trametes versicolor*, *Sporotrichum pulverulentum* 1767, *Acremonium* sp., *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, *P. chrysosporium* 1 MR-1.

4. *Trametes versicolor*, *Sporotrichum pulverulentum* 1766, *S. pulverulentum* 1767, *Acremonium* sp., *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, *P. chrysosporium* 1 MR-1.

1. По совокупности результатов (таблица 5) оптимальным был признан вариант 3.

Таким образом, были выделены ассоциации культур, максимально эффективно трансформирующие загрязнитель. Для опилок это комплекс непатогенных грибов *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 и 1 MR-1, *Sporotrichum pulverulentum* 1767 и *Acremonium* sp. Для гидролизного лигнина предложена модификация существующей микробной композиции *Trichoderma asperellum* 3.

Таблица 5 - Результаты компостирования опилок различными вариантами ассоциаций

Вариант	Убыль, %		Индекс ксилолиза	C/N	Фитотоксичность (% проросших семян)*
	лигнина	целлюлозы			
1	20.4	27.6	0.57	22.9	86
2	22.4	27.8	0.55	25.5	82
3	25.1	31.5	0.56	17.5	86
4	18.7	27.9	0.60	23.3	56

* - % проросших семян в контроле – 76 %

Скрининг микроорганизмов, способных к биоремедиации нефтезгрязненной почвы, выявил возможность создания как чисто бактериальной композиции, состоящей из *R. erythropolis* 108 и *A. guillouiae* (112, 114), так и бактериально-грибной смеси. Интересно, что культуры базидиомицетов *Trametes versicolor*, *Sporotrichum pulverulentum* 1766 и 1767 оказались эффективными как для трансформации опилок, так и для нефтедеструкции. Эксперименты по разложению модельных соединений позволили не только оценить деструктирующий потенциал микроорганизмов, но и выявить пути метаболизма этих соединений различными штаммами.

3 Симбиотическое взаимодействие микробных культур с почвенной биотой

Микроорганизмы, поступающие в почву вместе с микробными препаратами, вступают в различные взаимодействия с микробиотой и растениями, что обуславливает необходимость исследования их влияния на естественных обитателей почвы. В первую очередь важно понимать, как они воздействуют на растения, которые при выращивании в неблагоприятных условиях загрязнения могут быть восприимчивы даже к слабовирулентным штаммам. Микроорганизмы, участвующие в процессах биодеструкции органических субстратов, как правило, характеризуются широким спектром внеклеточных биологически активных метаболитов. Более того, растения способны селективно накапливать полезную микробиоту для создания наиболее благоприятных условий их роста и развития. В то же время, не исключено и подавление роста и развития растения за счет

появления в непосредственной близости от корня токсичных низкомолекулярных продуктов, образующихся в процессе деятельности микроорганизмов.

3.1 Фитозащитный эффект микроорганизмов-нефтедеструкторов

Первичный скрининг фитозащитной активности был проведен на семенах редьки масличной (*Raphanus sativus* var. *oleiferus*), т.к. это растение очень чувствительно к нефтезагрязнению. Выяснилось, что из шести использованных штаммов только *R. erythropolis* 108 снижает негативное влияние нефти на растение. Обработка семян суспензией бактерий *R. erythropolis* 108 повышает всхожесть на 25 % относительно контроля в условиях нефтезагрязнения, а у полученных из этих семян растений наблюдается увеличение длины корня на 50 % (рисунок 5), высоты надземной части и ее массы - на 40 %. Это свидетельствует о снижении ингибирующего действия нефти на растение.

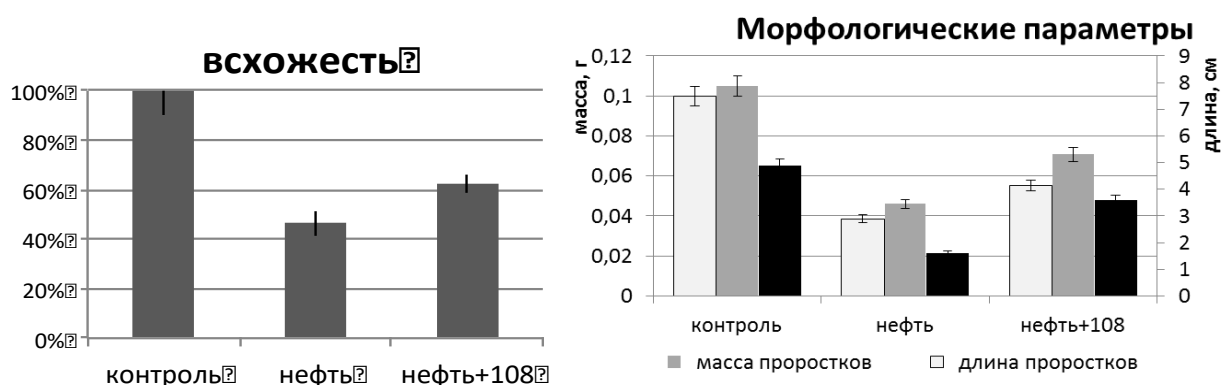


Рисунок 5 - Развитие *Raphanus sativus* при добавлении нефти и инокуляцией семян *R. erythropolis* 108.

На следующем этапе исследований оценивалось защитное действие *R. erythropolis* 108 на однодольные и двудольные растения с учетом размера их семени (кукуруза, райграс, горох, салат, редька) (рисунок 6). Нефтезагрязнение снижает всхожесть семян на 20 – 50 % в зависимости от вида растения. Предобработка семян взвесью микроорганизмов существенно улучшает морфологические параметры растений. Визуально заметно, что растения, выращенные из семян, обработанных *R. erythropolis* 108, в присутствии нефти лучше набирают листовую массу, чем необработанные растения. Присутствие

микроорганизмов нивелировало негативный эффект нефти на фотосинтезирующую систему растений, восстанавливая количество пигментов до исходного уровня. Вероятно, это связано с синтезом микроорганизмами биологически активных веществ аналогичных цитокининам растений.

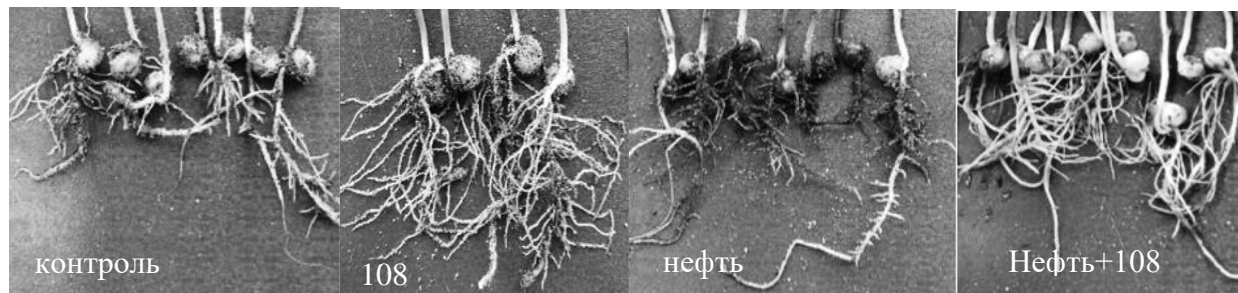


Рисунок 6 - Корневая система гороха

Интересно, что при выращивании обработанных микроорганизмами растений в незагрязненной почве наблюдается небольшой ростостимулирующий эффект, проявляющийся в увеличении всхожести семян. Это открывает перспективы использования родококка в качестве биоудобрения.

3.2 Синтез микроорганизмами биосурфактантов

Одним из механизмов нивелирования микроорганизмами отрицательного действия нефти и нефтепродуктов на растения является синтез сурфактантов. Способность образовывать их присуща микроорганизмам разных таксономических групп - *Dietzia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter* и *Geobacillus*, *Candida lipolytica*.

Для первичной оценки способности выделять поверхностно-активные вещества применялись косвенные методы. Интенсификация синтеза биосурфактантов осуществлялась с использованием гексадекана в качестве единственного источника углерода при выращивании микроорганизмов. Оказалось, что все грибы и *Streptomyces asterosporus* этой способностью не обладают. Бактерии и дрожжи синтезировали внеклеточные биосурфактанты (таблица 6). Количество клеточно-связанных биосурфактантов примерно одинаково для всех штаммов, кроме *T. cutaneum* D-46, который оказался

значительно более продуктивным. Показано, что *R. erythropolis* 108 и *T. cutaneum* D-46 являются эффективными продуцентами внеклеточных форм. Качественные реакции выявили в составе бактериальных биосурфактантов углеводный и липидный компоненты, а дрожжеподобных грибов - вещества липидной природы.

Таблица 6 - Показатели способности бактерий - нефтедеструкторов выделять поверхностно-активные вещества

Штамм	Диаметр чистых зон, см	Эмульгирующая активность	Индекс эмульгирования, %	Содержание биосурфактантов	
				клеточно-связанных, %	Внеклеточных, г/л
<i>R. erythropolis</i> 108	4.0±0.2	++	73	37.0	1.523
<i>A. guillouiae</i> 112	3.2±0.4	+	57	31.5	0.177
<i>A. guillouiae</i> 114	1.5±0.2	+	13	31.2	0.166
<i>T. cutaneum</i> D-46	0	++	54	63.3	0.891
<i>T. cutaneum</i> 5	0	++	52	25.2	0.181

Для *R. erythropolis* 108 и *A. guillouiae* 114 были сняты ИК-спектры в тонкой пленке (рисунок 7). Наиболее интенсивными в обоих спектрах являются полосы валентных колебаний CH_2 групп в интервале $2950\text{-}2855\text{ см}^{-1}$ и деформационных колебаний этих групп при 1460 и 722 см^{-1} .

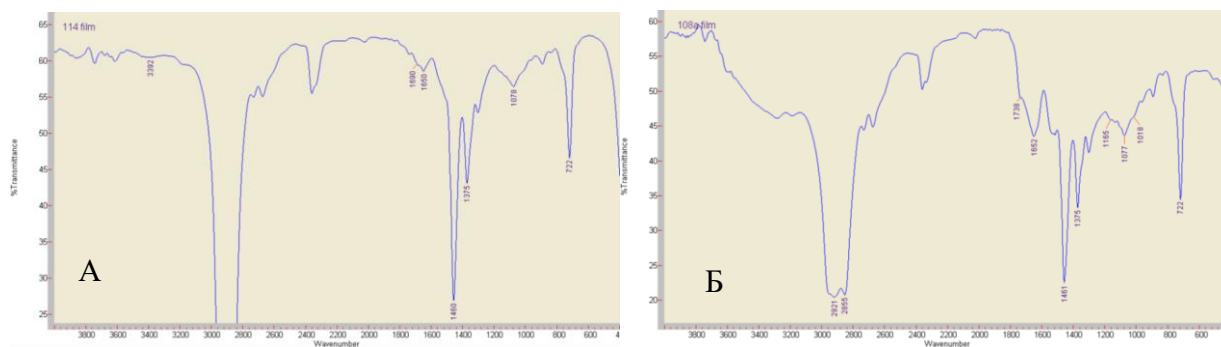


Рисунок 7 - ИК-спектр биосурфактанта, продуцируемого А - *R. erythropolis* 108, Б - *A. guillouiae* 114

В спектре биосурфактанта, продуцируемого штаммом *R. erythropolis* 108, широкая полоса поглощения в интервале 3400-2600 см⁻¹ характеризует колебания $\nu(\text{OH})$ ассоциированных гидроксильных групп. Полоса $\nu(\text{C}=\text{O})$ ассоциированной карбонильной группы расположена при 1652 см⁻¹. Простые эфирные и сложноэфирные группы характеризуются полосами с максимумами в интервале 1165-1018 см⁻¹, которые могут быть связаны с наличием фрагментов CH-O-CH и $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$. Колебанию $\nu(\text{C}=\text{O})$ свободной карбонильной группы соответствует слабое плечо при 1738 см⁻¹ на высокочастотном крыле полосы при 1652 см⁻¹. Дублетная полоса колебаний $\delta(\text{CH}_3)$ при 1375 см⁻¹ свидетельствует о возможном наличии разветвлённых $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -групп. Полученные данные позволяют предположить, что он представляет собой сложный эфир трегалозы и миколовых кислот. В ИК-спектре биосурфактанта, продуцируемого штаммом *A. guillouiae* 114, наряду с интенсивными полосами $\nu(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_2)$ и $\delta(\text{CH}_3)$, наблюдаются характеризующие его полосы, аналогичные наблюдаемым в спектре биосурфактанта, продуцируемого *Rhodococcus* 108, но еще менее интенсивные. Наличие в элементном составе азота позволяет предположить, что биосурфактант представляет собой липополисахарид, состоящий из трисахаридной основы (*D*-галактозамин + *D*-галактозаминуоновая кислота + диоксиаминогексоза), к которой через сложноэфирную и амидную связь присоединены остатки жирных кислот ($\text{C}_{10} - \text{C}_{22}$).

Выявленная способность *R. erythropolis* 108 синтезировать значительное количество внеклеточных биосурфактантов позволила предположить, что одним из механизмов его положительного влияния на выживаемость растений в условиях загрязнения почвы нефтью может быть эмульгирование нефтяной пленки на поверхности корней. Для подтверждения этой гипотезы было проведено исследование зоны корневых волосков с помощью световой микроскопии (рисунок 8). У растений, выращенных в условиях нефтезагрязнения, эта зона покрыта пленкой нефти, а количество корневых волосков крайне мало. При

обработке *R. erythropolis* 108 происходит элиминирование нефтяной пленки с поверхности корня, а развитие корневых волосков не отличается от их развития у контрольных растений.

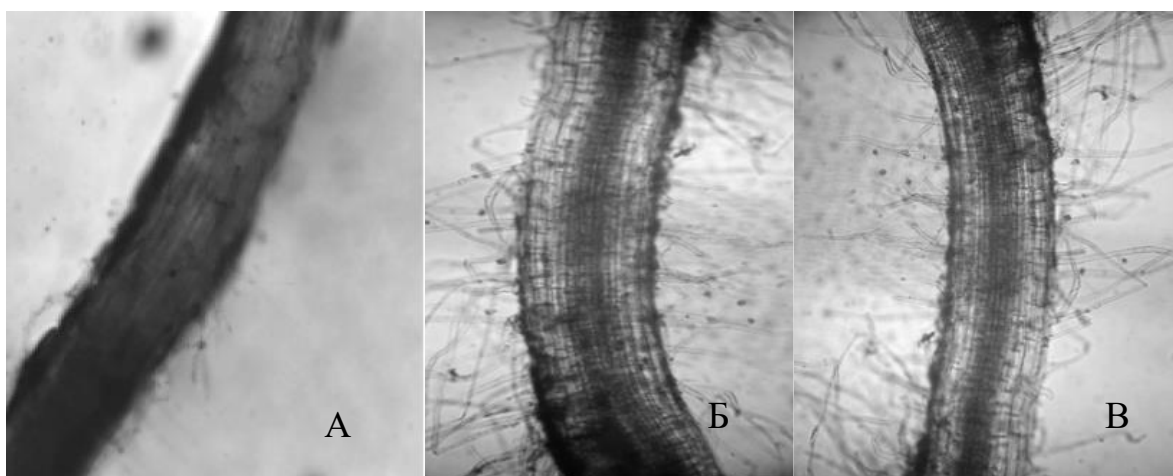


Рисунок 8 - Развитие корневой системы *Raphanus sativus* при добавлении нефти. А - нефть без бактерий, Б - нефть и добавление штамма 108, В - контроль без добавления нефти и бактерий, x100.

3.3 Синтез микроорганизмами биологически активных веществ

Большинство микроорганизмов, так или иначе взаимодействующих с растениями, способно синтезировать вещества с фитогормональной активностью, витамины, некоторые органические кислоты, аминокислоты, антибиотики и др. Несмотря на то, что синтез фитогормонов считается прерогативой клубеньковых или фитопатогенных микроорганизмов, многие свободноживущие виды также способны их синтезировать.

Ауксиновая активность микроорганизмов оказалась индуцибельной: при выращивании их на средах без триптофана данные фитогормоны не обнаруживались. Добавление к питательной среде аминокислоты приводило к образованию ауксинов практически всеми культурами. Высокая физиологическая активность синтезированных микроорганизмами ауксинов подтверждалась биотестами. Во всех экстрактах идентифицирована β -3-индолилуксусная кислота, а у дрожжеподобных грибов еще и γ -(3-индолил)-масляная кислота. Среди бактериальных культур выделялся *R. erythropolis* 108, синтезировавший

наибольшее количество ауксинов. Показательно, что способность к синтезу фитогормонов обусловлена не видовой характеристикой, а штаммовыми различиями. Это касается и грибных, и бактериальных культур. Так, *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, в отличие от *Phanerochaete chrysosporium* 1 MR-1, не способен синтезировать ауксины, а количество выделяемых ими гиббереллинов различается в два раза. Суммарная гиббереллиноподобная активность была обнаружена у всех грибов, кроме дрожжеподобных, а среди бактериальных культур только у *Pseudomonas* sp. 102.

Еще одними важными для растений внеклеточными метаболитами являются аминокислоты. Показано, что *S. asterosporus* синтезирует наиболее широкий спектр аминокислот в максимальной их концентрации. Через пять суток культивирования в супернатанте этого микроорганизма обнаруживались 18 разных аминокислот. При этом основная доля (61.5 %) приходилась на глутамин, содержание цистина также значительно (11.4 %).

3.4 Влияние культуральных фильтратов дереворазрушающих грибов на растения и почву

Синтез микроорганизмами фитогормонов и аминокислот обуславливает их влияние на процессы, происходящие в растениях. Использование для сравнения коммерческих растворов фитогормонов в рекомендованных дозах, и аминокислот в концентрациях, соответствующих таковым в фильтратах микроорганизмов, позволит предположительно соотнести физиологические эффекты культуральных фильтратов с содержащимися в них биологически активными веществами.

Установлено, что обработка культуральными фильтратами семян ячменя стимулирует в основном развитие корневой системы (увеличение средней длины корней на 12-32 %, а массы – на 28-78 %). Индукция ауксинов не влияет на общую картину. Ростки ячменя при некотором отставании длины имели массу, превышающую контроль или сопоставимую с ним. Применение стандартных растворов фитогормонов не оказывало достоверного стимулирующего действия на рост ячменя. В то же время обработка семян культуральными фильтратами в

значительной степени коррелировала с действием аминокислот. Однако воздействие культуральных фильтратов было более существенным, особенно для *S. asterosporus*.

Влияние культуральных фильтратов на рост пшеницы в основном проявлялось в увеличении массы корней (до 63 %). Наилучшие результаты были отмечены для культурального фильтрата *P. citreo-viride*. Все культуры, выращенные на средах с триптофаном, значительно увеличивали длину и массу проростков (80 % по сравнению с контролем), что существенно превышает эффект стандартного гетероауксина. Корреляции между действием исследованных аминокислот и культуральных фильтратов для пшеницы не выявлено.

Семена гороха оказались наиболее отзывчивыми на обработку культуральными фильтратами. Среди культур выделялся *S. pulverulentum*, который значительно стимулировал рост гороха (средние показатели превышали 200 %). Анализируя действие стандартных фитогормонов на изменение биометрических показателей этого представителя двудольных растений, можно с большой долей вероятности утверждать, что эффект обусловлен гиббереллиноподобными веществами.

Развитие проростков кукурузы ингибировалось всеми культуральными фильтратами, кроме *T. cutaneum* 5, воздействие которого привело к увеличению массы корней на 28 % за счет развития боковых корней.

3.5 Антагонистическое действие микроорганизмов

Практически все актиномицеты, многие грибы и бактерии способны образовывать вещества, подавляющие рост других микроорганизмов, а ризосферные микроорганизмы часто бывают антагонистами фитопатогенных бактерий и грибов. Нами оценена антагонистическая активность исследуемых микроорганизмов по отношению к бактериям, относящимся к различным таксономическим группам и фитопатогенному *Fusarium orthoceras* (таблица 7).

Таблица 7 - Антибиотическая активность исследуемых микроорганизмов

Исследуемая культура	Диаметр зоны подавления роста, мм				
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. durans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>F. orthoceras</i>
<i>T. cutaneum</i> D-46	11±0.2	2±0.1	15±0.2	11±0.2	не опр.
<i>T. cutaneum</i> 5	10±0.2	1±0.1	17±0.2	11±0.1	не опр.
<i>Trametes versicolor</i>	1±0.1	0	6±0.1	1±0.1	6±0.5
<i>Ph. chrysosporium</i> ATCC 24725	0	0	6±0.1	0	3±0.2
<i>Ph. chrysosporium</i> 1 MR-1	0	6±0.1	5±0.1	0	7±0.7
<i>S. pulverulentum</i> 1767	13±0.1	7±0.2	7±0.1	13±0.5	11±0.5
<i>P. citreo-viride</i>	0	0	0	1±0.1	-
<i>Acremonium</i> sp.	13±0.2	11±0.2	5±0.1	2±0.1	не опр.
<i>A. guillouiae</i> 112	2±0.1	6±0.2	7±0.1	11±0.2	не опр.
<i>R. erythropolis</i> 108	8±0.1	12±0.3	13±0.1	14±0.9	не опр.
<i>A. guillouiae</i> 114	2±0.1	8±0.2	7±0.1	11±0.3	не опр.

Наиболее активными по отношению к бактериальным культурам оказались штаммы *R. erythropolis* 108 и *S. pulverulentum* 1767, эффективно подавляющие рост всех исследованных культур. Высокой антибиотической способностью характеризуются также оба штамма *T. cutaneum*. Максимальную фунгицидную активность проявляет *S. pulverulentum* 1767.

Обнаруженное нами подавление суспензией микроорганизмов роста патогенных бактерий имеет важное практическое значение и может применяться для оздоровления почв.

Таким образом, установлено, что исследованные микроорганизмы выделяют в культуральную жидкость разнообразные биологически активные вещества. Образование фитогормонов положительно влияет на рост и развитие растений, а присутствие биосурфактантов снижает стрессовое воздействие гидрофобных субстратов на растение. Антибактериальная и фунгицидная активности обеспечивают оздоровление почвы, что также улучшает состояние растений. Комплекс образующихся БАВ обеспечивает исследованным штаммам преимущества как активным деструкторам органических субстратов и

фитозащитным микроорганизмам. Кроме того, это способствует их высокой активности при трансформации органических субстратов.

4 Микробная трансформация субстратов как способ восстановления почвенных экосистем

Процессы, протекающие при микробной трансформации различных субстратов, характеризуются, прежде всего, формированием сукцессии микроорганизмов, присущей только конкретным субстратам, активными изменениями в химическом и ферментативном спектре субстрата, его дыхании и фитотоксичности. Для целенаправленного управления процессами биотрансформации необходимо изучение динамики их физико-химических, биохимических и микробиологических параметров.

Микробиологический анализ компостируемой смеси на основе лигноцеллюлозных субстратов с добавлением микробной ассоциации выявил резкое возрастание численности микроорганизмов практически всех физиологических групп в начале компостирования. Максимумы количества аэробных целлюлозолитиков и термофилов коррелировали с максимумами температуры (рисунок 9). Общее содержание микроорганизмов стабилизировалось к окончанию компостирования, оставаясь на достаточно высоком уровне. Следовательно, к данному периоду сформировалось устойчивое микробное сообщество, что служит косвенным показателем готовности продукта. В то же время количество микроорганизмов в контрольном эксперименте было существенно ниже, чем в опытном. Контрольный бурт довольно быстро (в течение 2 нед.) заселяли актиномицеты, тогда как количество бактерий и грибов долго оставалось незначительным. В процессе компостирования наблюдались небольшие колебания численности микроорганизмов с общей тенденцией к увеличению их числа по всем исследованным группам.

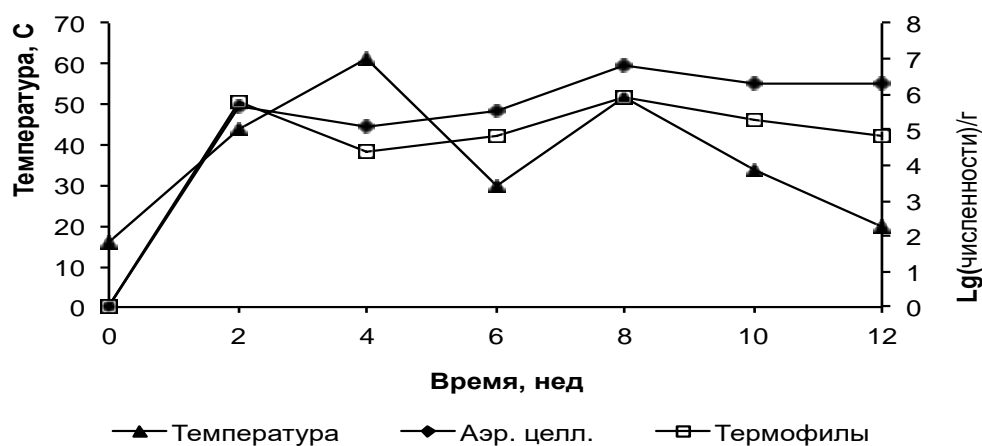


Рисунок 9 - Динамика количества термофилов и аэробных целлюлозолитиков в процессе компостирования гидролизного лигнина

При применении бактерий-нефтедеструкторов мы исследовали как интактную почву, так и искусственно загрязненную нефтью. Согласно полученным результатам, внесение нефти в почву приводит к изменениям в структуре сообщества почвенных микроорганизмов при возрастании общего их количества, что может быть связано с использованием ими нефти в качестве дополнительного источника углерода.

Внесение в загрязненную почву исследуемых штаммов микроорганизмов способствует изменению соотношения их отдельных групп, связанному преимущественно со стимуляцией роста бактерий. Тот факт, что при добавлении консорциума микроорганизмов структура микробного сообщества практически не отличается от таковой в незагрязненной почве, свидетельствует о восстановлении почвенных популяций.

Исследование ферментов созревающего компоста выявило высокую корреляцию активности оксидоредуктаз с изменением температуры компостного бурта (рисунок 10А). К концу компостирования их активность снижалась практически до нуля. Полифенолоксидазная активность в контроле появилась только к 6 нед. наблюдения, и динамика ее в дальнейшем полностью соответствовала таковой в опытном бурте, но с меньшими значениями активности.

Активность пероксидазы и каталазы, кроме более низких значений, характеризовалась дополнительными максимумами, последний из которых (для пероксидазы) приходился на 11 нед.; в это время в опытном бурте пероксидазная активность уже не определялась. Это свидетельствует о замедленном, по сравнению с компостом, процессе деструкции лигнина.

Активность инвертазы возрастала после 6 нед. компостирования и стабилизировалась к 13 нед. Динамика целлюлазной активности коррелировала с максимумами температуры и количеством аэробных целлюлозолитиков (рисунок 10Б). Целлюлазная и инвертазная активности в контроле характеризовались более низкими показателями и отсутствием максимума через 4 нед. эксперимента.

При биоремедиации была исследована ферментативная активность незагрязненной почвы, показавшая отсутствие пероксидажной и средний уровень полифенолоксидазной и каталазной активности (таблица 8). Введение нефти в почву резко увеличивает активность исследуемых ферментов уже через пять суток после внесения. Это связано с активизацией почвенных микроорганизмов, которые вынуждены одновременно нейтрализовать большое количество токсичных соединений. Через два месяца активность ферментов снижается, не достигая, однако, уровня незагрязненной почвы.

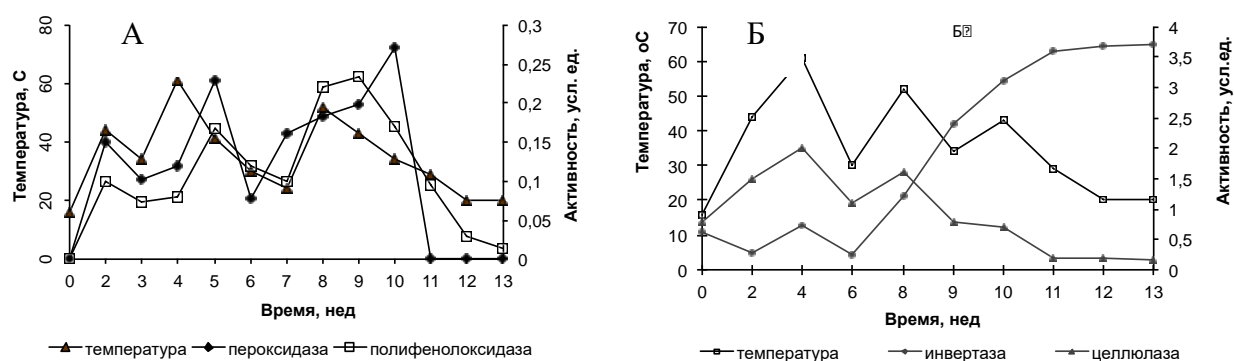


Рисунок 10 - Изменение активности ферментов: А – пероксидазы и полифенолоксидазы; Б – гидролаз в процессе компостирования гидролизного лигнина

Разные штаммы *A. guillouiae* по-разному влияют на активность исследуемых ферментов. Штамм 112 увеличивает активность всех трех оксидоредуктаз через пять суток после начала эксперимента. Данный штамм характеризуется высокой скоростью разложения ароматической составляющей нефти, что способствует выделению в водную фазу значительного количества низкомолекулярных фенольных веществ, являющихся продуктами и субстратами исследуемых ферментов. При воздействии штамма 114 наблюдается обратная картина: максимальная активность ферментов приходится на конец исследования. Скорее всего, это связано с различными путями деструкции компонентов нефти этими микроорганизмами. *R. erythropolis* 108 практически не влиял на ферментативную активность. Действие консорциума на динамику пероксидазы и каталазы было подобно действию *A. guillouiae* 112, а активность полифенолоксидазы увеличивалась лишь к концу эксперимента.

Известно, что попадание в почву токсичных продуктов разложения конденсированных ароматических соединений приводит к замедлению развития растений. Более того, даже сублетальные концентрации загрязнителя значительно тормозят их рост. Поэтому один из наиболее важных параметров, влияющих на почвенные экосистемы – фитотоксичность.

Таблица 8 Ферментативная активность почвы при модельном нефтезагрязнении

	Пероксидазы, ЕД/мг белка		Каталаза, ЕД/мг белка		Полифенолоксидазы, ЕД/мг белка	
	5 сут.	60 сут.	5 сут.	60 сут.	5 сут.	60 сут.
K1 ¹	0	0	0.023±0.09	0.001±0.018	0.513±0.01	0
K2 ²	0.595±0.02	0.375±0.01	0.0531±0.012	0.0391±0.01	1.25±0.02	0.366±0.05
K2+108	0	0.488±0.02	0.0148±0.05	0.0386±0.012	0.375±0.02	0.238±0.05
K2+112	1.538±0.03	0	0.0716±0.015	0.0195±0.014	1.053±0.01	0.244±0.014
K2+114	0	1.31±0.02	0.029±0.02	0.0586±0.026	0.875±0.01	3.095±0.012
K2+108+112+114	0.581±0.01	0	0.058±0.02	0.0342±0.05	0	1.538±0.01

¹ - K1- незагрязненная почва

² - K2 –почва, загрязненная нефтью без бактерий

Исследование выявило, что исходный субстрат (ГЛ или опилки) не обладает фитотоксичностью, но уже двухнедельная его переработка ведет к значительному ее повышению. При этом фитотоксичность четко коррелирует с активностью ферментов. Максимальная фитотоксичность совпадает по времени с первыми максимумами активности пероксидазы и ПФО. Установлено, что для снижения токсичности до уровня интактной почвы необходимо компостирование в течение 3 мес.

Оценка фитотоксичности почвы, подвергающейся биоремедиации, основанная на определении прямого токсического эффекта преимущественно водорастворимых соединений, показала, что наиболее чувствительны к воздействию нефти семена редиса. Через две недели после внесения в почву сырой нефти происходило резкое снижение всхожести его семян. Однако во всех последующих опытах она практически не отличалась от контроля. Вероятно, в первые две недели эксперимента токсический эффект оказывает быстрорастворимая фракция нефти, а основные компоненты нефти остаются неизменными, о чем свидетельствует отсутствие фитотоксичности. Максимумы фитотоксичности нефтезагрязненной почвы, обработанной *A. guillouiae* (112 и 114), коррелировали с присутствием в культуральной жидкости наибольшего количества фенольных соединений, выявляемого ВЭЖХ. Наименьший токсический эффект на семена редиса на протяжении всего эксперимента оказывала почва, обработанная *R. erythropolis* 108. Через восемь недель после внесения нефти и бактерий фитотоксичность практически не отличалась от контроля. С увеличением размера семени влияние нефтезагрязнения на всхожесть сдвигается на более поздние сроки после внесения нефти.

Вероятнее всего, основную фитотоксичность обуславливают низкомолекулярные фенольные вещества, образующиеся в процессе деструкции как нефти, так и лигнина. Известно, что подобные соединения способны оказывать влияние на рост и развитие растений. Для подтверждения этого нами исследовано действие некоторых фенолокислот на всхожесть семян пшеницы, а

также рост и развитие растений в вегетационных опытах. Оказалось, что токсический эффект фенолокислот коррелирует с их концентрацией и полностью исчезает лишь при содержании действующих веществ ниже 0.01 %.

Еще одним важным фактором, характеризующим процессы восстановления почвы в ходе ее ремедиации, является интенсивность дыхания. Плавное снижение дыхания почвы, связанное с исчерпанием доступного субстрата и характерное для инкубационных экспериментов, наблюдалось во всех вариантах опыта к 40 – 54 сут. исследования. Внесение штамма *R. erythropolis* 108 стимулировало эмиссию углекислого газа на 74 % относительно загрязненной нефтью почвы. Высокий уровень эмиссии CO₂ отмечался при внесении в почву штамма *A. guillouiae* 114 и консорциума микроорганизмов. Внесение штамма *A. guillouiae* 112, напротив, подавляло выделение CO₂ относительно загрязненной нефтью почвы. При этом снижение эмиссии по времени совпадало с периодом высокой фитотоксичности.

Развитие микробной сукцессии при трансформации лигноцеллюлозных субстратов приводит к изменениям их физико-химических параметров. Анализ динамики температуры во всех полупромышленных экспериментах показал, что подъемы температуры связаны с перемешиванием компостов (через 3, 7, 10 недель после начала компостирования), приводящим к улучшению их аэрации и интенсификации микробных процессов. Отсутствие подъема температуры после перемешивания указывало на окончание ферментации. Хорошая корреляция результатов для опилок и ГЛ позволяет говорить о схожести процессов, несмотря на различия в субстратах.

Исходные лигноцеллюлозные субстраты крайне бедны основными биогенными элементами. Так, количество азота, фосфора и калия в опилках варьирует от следовых до 0.4 %, а гуминовые кислоты полностью отсутствуют, поэтому для интенсификации микробных процессов в начале компостирования были добавлены минеральные компоненты.

Агрохимический анализ созревающих компостов выявил увеличение содержания гуминовых кислот, подвижных форм азота и фосфора в течение всего срока компостирования. Емкость катионного обмена определяли только для опилочных компостов. Показано, что она возрастает до уровня таковой для верхового торфа, а гидролитическая кислотность оказывается существенно ниже. Интересно, что варьирование вида древесных опилок, места и времени проведения компостирования практически не влияют на агрохимические показатели готового продукта.

Таким образом, выявлена однотипность процессов, протекающих при трансформации различных органических субстратов высокоактивными микроорганизмами. Максимумы активности оксидоредуктазных ферментов, совпадающие с увеличением фитотоксичности, служат одним из основных доказательств интенсивности происходящих изменений. Параллельно происходит направленное изменение количества основных групп микроорганизмов, индуцированное как внесением микробной ассоциации, так и наличием продуктов промежуточного разложения субстрата. Можно утверждать, что микробная переработка обязательно сопровождается всплеском токсичности перерабатываемого субстрата, однако за счет эффективного действия ферментов и увеличения численности микроорганизмов, различных по субстратной специфичности и типу питания, к окончанию переработки токсичность не отличается от контроля, а все показатели биологической активности нормализуются. Внесение микроорганизмов в лигноцеллюлозные субстраты увеличивает в созревающем компосте количество основных биогенных элементов (как валового содержания, так и их подвижных форм), а также гуминовых кислот. Готовые компосты характеризуются оптимальной кислотностью (рН 6.2-7.7), высокой емкостью катионного обмена (9-11 мг*экв/100 г) и низкой гидролитической кислотностью (1.12-1.17 мг*экв/100 г). Все эти параметры являются показателями высокого качества органического удобрения.

5 Восстановление техногенно-нарушенных земель с помощью микробных ассоциаций или продуктов на их основе

Для биоремедиации почв, загрязненных нефтью, нами разработан микробный препарат, состоящий из смеси равных объемов суспензии микроорганизмов с содержанием каждого компонента не менее 1×10^5 КОЕ/г. Для удобства использования, транспортировки, а также для увеличения срока годности биомасса микроорганизмов наносится на стерильный носитель, в качестве которого можно использовать цеолит с размером гранул 1-3 мм. Приготовленную смесь высушивали нестерильно при комнатной температуре в течение 1-3 сут. до влажности не более 10 %.

Для определения эффективности препарата суспензию микроорганизмов вносили в нестерильную почву, искусственно загрязненную нефтью в концентрации 10 % (масс.). Инкубирование проводили в течение 60 сут. при 25 °С. Через два месяца в пробах почвы определяли убыль нефти. Для предложенного препарата она составляет 62 % (рисунок 11).

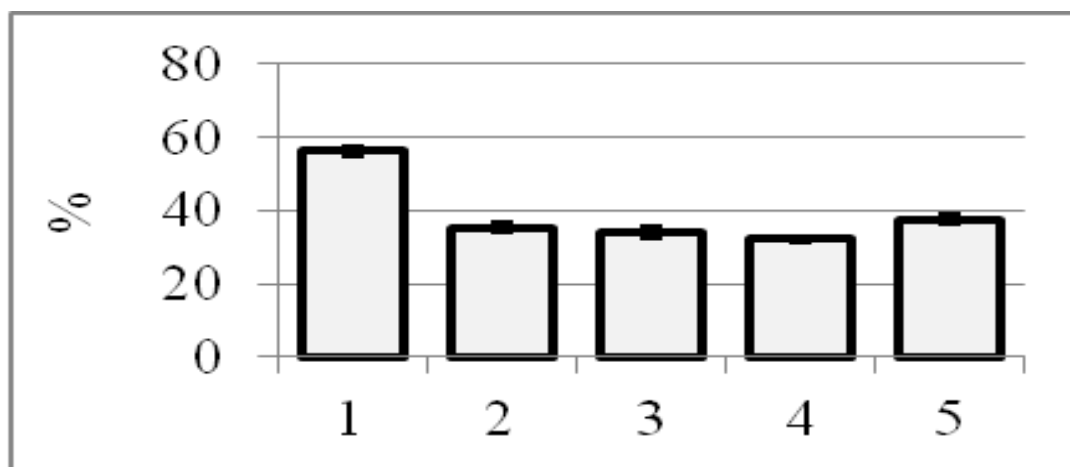


Рисунок 11 - Остаточное содержание нефти в почве через 60 сут. эксперимента (%): 1 – загрязненная почва без внесения бактерий, 2 – загрязненная почва + *R. erythropolis* 108, 3 – загрязненная почва + *A. guillouiae* 112, 4 – загрязненная почва + *A. guillouiae* 114, 5 – загрязненная почва + консорциум микроорганизмов (108+112+114).

Несмотря на отсутствие значимых различий между остаточным содержанием нефти при разложении индивидуальными штаммами и ассоциацией, рекомендуется использование комплексного препарата, т.к. совместная деятельность микроорганизмов в полевых условиях более эффективна за счет большего разнообразия внеклеточных метаболитов, лучшей способности к взаимодействию с микро- и макрофлорой загрязненного участка.

С целью выявления эффективности компостов на основе опилок были проведены вегетационные опыты (таблица 9). Редис и томат оказались наиболее отзывчивыми на внесение удобрения, все исследованные параметры увеличивались более чем на 50 %. Развитие остальных сельскохозяйственных культур также ускорялось, особенно заметно увеличение корневой части растения.

Проведение полевых опытов на опилочных компостах было ограничено определением урожайности картофеля. Компост вносили по 0,2 кг в лунку перед посадкой или под перепахку из расчета 1 кг/м². Повышение урожайности достигало 40-50 %.

Таблица 9 - Результаты вегетационных исследований сельскохозяйственных культур при внесении компоста из опилок

	Росток		Корень	
	длина, %*	масса, %*	длина, %*	масса, %*
контроль	100	100	100	100
Горох	122	143	100	158
Пшеница	100	121	147	137
Редис	не опр.	179	не опр.	212
Огурец	112	114	144	186
Томат	153	145	171	185

* - по отношению к контролю при дозе внесения 1 кг/м².

В ходе полевых опытов выявлено повышение урожайности пшеницы и ячменя при внесении лигнинового компоста в дозе 10 т/га в среднем на 130 % и 67 % соответственно. Исходный ГЛ, как сам по себе, так и с минеральными добавками в дозе, соответствующей таковой компоста, не оказывал достоверного влияния на урожайность исследованных культур.

Визуальные наблюдения посевов кукурузы (рисунок 12) показали, что опытные растения характеризуются более темной окраской, значительно большей высотой и листовой массой. Урожайность зеленой массы кукурузы при внесении лигнокомпоста в дозе 60 и 30 т/га увеличилась на 215 и 135 % соответственно.

Перегной в тех же дозах и сложное минеральное удобрение обеспечивали меньшее повышение урожайности (на 30-56 %). Варианты с внесением компоста под картофель в дозе 10 и 20 т/га достоверно превосходили по урожайности контрольный опыт. Однако, в данном случае прирост урожая за счет компоста оказался несущественным по сравнению с прибавкой, обеспеченной минеральным удобрением.



Рисунок 12 - Влияние компоста на рост кукурузы (справа –контроль)

Таким образом, результатом практического применения созданных нами микробных ассоциаций является трансформация исследуемых субстратов до экологически безопасных продуктов, а в случае лигноцеллюлозного сырья - получение высококачественного органо-минерального удобрения. Производимые по предложенному нами способу удобрения достоверно увеличивают урожайность сельскохозяйственных культур, пригодны для использования в качестве грунтов для теплиц, при правильном внесении способны стимулировать развитие сукцессии микроорганизмов в почве. Положительное влияние компостов

на плодородие почв также проявляется в накоплении гумуса, фосфора, азота и калия. Удобрение не содержит фитопатогенных микроорганизмов и паразитов, а содержание токсичных и опасных веществ в нем значительно ниже их предельно допустимых концентраций, установленных для почв.

5 Депонирование штаммов

Исследованные культуры самых активных микроорганизмов – деструкторов углеводов нефти депонированы во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов на базе Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН Федеральный исследовательский центр "Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук" под следующими номерами:

Rhodococcus erythropolis 108 — ВКМ В- Ас-2784D,

Acinetobacter guillouiae 112— ВКМ В-3216D,

Acinetobacter guillouiae 114 — ВКМ В-3217D.

ВЫВОДЫ

1. В результате скрининга культур, выделенных из лигноцеллюлозных субстратов, почвы, эндо- и ризосферы растений нефтезагрязненных территорий, а также коллекционных культур, разработаны композиции микроорганизмов, максимально эффективно деструктирующие органические субстраты до нетоксичных соединений, а, в случае лигноцеллюлозных отходов, способные к созданию высококачественного органо-минерального удобрения в короткие сроки (за три месяца). Показано, что биоремедиация почв, загрязненных нефтью, возможна как чисто бактериальной композицией, так и бактериально-грибной.
2. Оценен эколого-биохимический потенциал микроорганизмов на примере соединений, моделирующих фрагменты субстратов, и выявлены основные пути метаболизма этих соединений различными штаммами. Показано, что бактериальные культуры деструктируют ароматические соединения с образованием салициловой кислоты и пирокатехина, а штамм *Acinetobacter*

guillouiae 112 реализует дополнительный путь деструкции полиароматических углеводородов с образованием протокатеховой кислоты. Скорость разложения соединений, моделирующих фрагменты и химические связи гидролизного лигнина, в основном зависит от наличия заместителя в фенольной гидроксильной группе.

3. Установлена однотипность процессов, происходящих при компостировании лигноцеллюлозных отходов и ремедиации загрязненных нефтью почв. Доказано, что всплеск фитотоксичности, наблюдаемый при трансформации субстратов, происходит за счет эффективной деятельности оксидоредуктазных ферментов и увеличения численности микроорганизмов, различных по субстратной специфичности и типу питания. Это приводит к ускорению процессов, что значительно сокращает сроки трансформации всех исследуемых субстратов.

4. Выявлена многофакторная симбиотическая деятельность микроорганизмов с различными объектами почвенной экосистемы, реализующаяся через синтез внеклеточных биологически активных соединений и позитивно влияющая на свойства компоста и восстановление экологически значимых свойств почвы:

а) установлено фитостимулирующее действие микроорганизмов, основанное на их способности синтезировать биологически активные вещества, такие как аминокислоты и фитогормоны. Выявлена их гиббереллиноподобная и ауксиновая активность, обусловленная не видовой характеристикой, а штаммовыми различиями.

б) выявлена способность микроорганизмов синтезировать биогенные поверхностно-активные вещества – биосурфактанты, исследованы их структура и основные физико-химические свойства. Доказано, что влияние этих соединений на выживаемость растений в условиях загрязнения почвы нефтью происходит за счет эмульгирования нефтяной пленки на поверхности корней.

5. Доказано, что применение консорциума, созданного для биоремедиации нефтезагрязненных почв, повышает степень их очистки от загрязнения,

способствуя восстановлению агрохимических свойств. Внесение микроорганизмов в трансформируемые лигноцеллюлозные субстраты увеличивает количество основных биогенных элементов (как валового содержания, так и их подвижных форм), а также гуминовых кислот, приводя к образованию высококачественного удобрения. Полученное удобрение стимулирует развитие сукцессии микроорганизмов в почве, достоверно увеличивает урожайность сельскохозяйственных культур, не содержит фитопатогенных микроорганизмов и паразитов, пригодно для использования в качестве грунтов для теплиц.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Экспериментальные статьи в рецензируемых журналах (индексируемые в базе WoS/Scopus):

1. Волчатова, И. В. Микробиологическое и биохимическое исследование лигнокомпоста в процессе созревания / И. В. Волчатова, Л. А. Беловежец, С. А. Медведева // Микробиология. – 2002. – Т. 71, 14. – С. 545–549.

2. Беловежец, Л. А. Эффективность лигнокомпоста в зависимости от его агрохимических и биологических показателей при выращивании зерновых культур / Л. А. Беловежец, И. В. Волчатова, С. А. Медведева // Агрохимия. – 2005. – № 1. – С. 38–43.

3. Волчатова, И. В. Продуктивность агроценозов при использовании продуктов биоконверсии гидролизного лигнина / И. В. Волчатова, С. А. Медведева, М. В. Бутырин, Л. А. Беловежец // Агрохимия. – 2005. – № 5. – С. 55–58.

4. Беловежец, Л. А. Ростстимулирующая активность фракций компоста на основе гидролизного лигнина / Л. А. Беловежец, И. В. Волчатова, С. А. Медведева // Агрохимия. – 2005. – № 7. – С. 29–35.

5. Беловежец, Л. А. Дереворазрушающие грибы как регуляторы роста растений / Л. А. Беловежец, И. В. Волчатова, С. А. Медведева // Микология и фитопатология. – 2007. – Т. 41, вып. 5. – С. 436–442.

6. Маркова, Ю. А. Возможности адаптации условно патогенных энтеробактерий к различным температурам / Ю. А. Маркова, Л. А. Беловежец, И. Ю. Баров, Е. Д. Савилов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2009. – № 2. – С. 15–18.

7. Беловежец, Л. А. Перспективные способы переработки вторичного лигноцеллюлозного сырья (обзор) / Л. А. Беловежец, И. В. Волчатова, С. А. Медведева // Химия растительного сырья. – 2010. – № 2. – С. 5–16.

8. Беловежец, Л. А. Деструкция модельных соединений лигнина пионерными штаммами грибов-колонизаторов древесных отходов / Л. А. Беловежец, И. В. Волчатова, С. А. Медведева // Химия в интересах устойчивого развития. – 2010. – № 18. – С. 25–31.

9. Беловежец, Л. А. Возможные пути деструкции полиароматических углеводов нефти некоторыми видами бактерий-нефтедеструкторов, выделенными из эндо- и ризосферы растений / Л. А. Беловежец, Л. Е. Макарова, М. С. Третьякова, Ю. А. Маркова, Л. В. Дударева, Н. В. Семенова // Прикладная биохимия и микробиология. - 2017. – Т. 53, № 1. – С. 1–6.

10. Третьякова, М. С. Исследование способности бактерий-нефтедеструкторов снижать токсическое действие нефти на растения / М. С. Третьякова, Л. А. Беловежец, Ю. А. Маркова, Л. Е. Макарова // Агрехимия. – 2017. – № 12. – С. 46–51.

11. Tretyakova, M. S. Possible use of oil-degrading microorganisms for protection of plants growing under conditions of oil pollution / M. S. Tretyakova, M. V. Ivanova, L. A. Belovezhets, Yu. A. Markova // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. – 2019. – V. 315 (072046) P. 1–6. – doi:10.1088/1755-1315/315/7/072046

12. Belovezhets, L. A. Use of rhizosphere microorganisms for bioremediation of oil contaminated soils / L. A. Belovezhets, M. S. Tretyakova, Yu. A. Markova, A. A.

13. Беловежец, Л. А. Агрохимические показатели компоста на основе древесных опилок / Л. А. Беловежец, А. В. Третьяков // Химия в интересах устойчивого развития. – 2020. – № 2. – С. 124-130.

Прочие:

1. Беловежец, Л. А. Стимуляция развития растений культуральными жидкостями микроорганизмов / Л. А. Беловежец, И. В. Волчатова, С. А. Медведева / Владимирский земледелец. – 2004. – № 3–4. – С. 27.

2. Волчатова, И. В. Дрожжеподобные грибы – источник получения биологически активных добавок / И. В. Волчатова, С. А. Медведева, Л. А. Беловежец, Э. И. Коломиец // Успехи медицинской микологии. - М.: Национальная академия микологии, 2005. – Т. 5. – С. 185–186.

3. Беловежец, Л. А. Биологическая активность культуральных фильтратов лигнинолитических микроорганизмов / Л. А. Беловежец, И. В. Волчатова, С. А. Медведева // Земледелие. – 2006. – № 2. – С. 14–16.

5. Беловежец, Л. А. Компостирование опилок: скрининг культур и их физиологическая активность / Л. А. Беловежец, И. В. Волчатова, С. А. Медведева // Вестник ИГУ. Сер. Биологическая. – 2009. – № 2. – С. 19–24.

6. Третьякова, М. С. Взаимодействие с растениями бактерий-нефтедеструкторов / М. С. Третьякова, Л. А. Беловежец, Е. Г. Рихванов, Н. В. Дорофеев, Ю. А. Маркова // Актуальные проблемы науки Прибайкалья. Иркутск: Изд-во ИНЦ СО РАН. – 2015. – Вып. 1. – С. 251–256.

7. Третьякова, М. С. Скрининг бактерий, ассоциированных с растениями, по способности деструктировать компоненты нефти / М. С. Третьякова, Л. А. Беловежец, Ю. А. Маркова // Системы. Методы. Технологии. – 2015. – №4 (28). – С. 138–142.

8. Третьякова, М. С. Углеводородокисляющие микроорганизмы, выделенные из эндо- и ризосферы растений / М. С. Третьякова, Л. А. Беловежец, Ю. А.

Маркова, Л. Е. Макарова // Актуальная биотехнология. – 2017. – № 2 (21). – 134–135.

9. Беловежец, Л. А. Изменение физиологического состояния почвы, загрязненной нефтью, при внесении нефтедеструкторов / Л. А. Беловежец, М. С. Третьякова, Ю. А. Маркова // Актуальные проблемы науки Прибайкалья. Иркутск: Изд-во ИНЦ СО РАН. – 2017. – Вып. 2. – С. 32–37.

10. Беловежец, Л. А. Биосурфактанты, синтезируемые микроорганизмами-нефтедеструкторами: состав, свойства и перспективы использования / Л. А. Беловежец, М. С. Третьякова, Ю. А. Маркова, Л. П. Ознобихина // Актуальная биотехнология. – 2019. – № 3 (30), С. 514.

Патенты на изобретения

1. Беловежец, Л. А. Способ утилизации древесных опилок с применением композиции дереворазрушающих микроорганизмов для получения комплексного органо-минерального удобрения / Л. А. Беловежец // Патент РФ № 2701942. – Оpubл. 2019 г.

2. Беловежец, Л. А. Микробный препарат для биоремедиации почвы, загрязненной нефтью и нефтепродуктами / Л. А. Беловежец, М. С. Третьякова, Ю. А. Маркова // Патент РФ № 2705290. – Оpubл. 2019 г.

Заказ № 179 Тираж 150 шт.
Отпечатано в центре печати «С+»
г. Иркутск, ул. Лермонтова ,128.