

На правах рукописи



ТРЕТЬЯКОВА
Марина Сергеевна

**ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭНДО- И РИЗОСФЕРНЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЗАГРЯЗНЕННЫХ
НЕФТЬЮ ПОЧВ**

03.02.08 – Экология
(биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск – 2018

Работа выполнена в лаборатории растительно-микробных взаимодействий в ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск.

- Научный руководитель:* **Маркова Юлия Александровна**, доктор биологических наук Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск.
- Научный консультант:* **Беловежец Людмила Александровна**, кандидат биологических наук Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск.
- Официальные оппоненты:* **Позднякова Наталия Николаевна**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН), г. Саратов.
Брянская Алла Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярных биотехнологий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), г. Новосибирск.
- Ведущая организация:* Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина Российской академии наук» (ИБФМ РАН), г. Пущино.

Защита диссертации состоится 24 мая 2018 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 212.074.07 при ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет» по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, Байкальский музей им. профессора М. М. Кожова (ауд. 219).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «ИГУ» им. В. Г. Распутина по адресу: 664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 124, и на сайте Иркутского государственного университета: <https://isu.ru/ru/science/boards/dissert/dissert.html?id=136>

Отзыв 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 «___» марта 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



А. А. Приставка

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Нефть и нефтепродукты являются одними из самых распространенных загрязнителей окружающей среды. Разливы нефти, вызываемые авариями при ее добыче и переработке, при разгерметизации нефтепроводов наносят ощутимый вред экосистеме. Ежегодные потери составляют около 5 % от всей добытой нефти. При этом основную техногенную нагрузку испытывает почва. За счет своей значительной адсорбирующей поверхности она способна аккумулировать загрязнения в больших количествах, что приводит к изменению агрохимических, физических, микробиологических характеристик и утрате плодородия. Эта проблема актуальна и для Иркутской области, на территории которой сосредоточены 12 крупных нефтяных месторождений, проходят две линии подземного магистрального трубопровода. В связи с тем, что процесс естественного восстановления почвы загрязненной нефтью очень долгий и может составлять от 10 до 30 лет, особенно в условиях Сибири, где продолжительное время сохраняется пониженная температура, необходима разработка технологий очистки почвы от нефти.

В настоящее время наиболее эффективным, экономичным, экологически безопасным методом по очистке нефтезагрязненных территорий является биоремедиация на основе микроорганизмов, способных разлагать углеводороды нефти (Хабибуллина и др., 2002; Плешакова и др., 2008; Kumar et al., 2011; Назина и др., 2013; Мязин, 2014; Fuentes et al., 2014; Xenia et al., 2016; Тарабукина и др., 2017). Для ликвидации последствий разливов нефти необходим поиск и выделение аборигенных штаммов, поскольку они адаптированы к региональным почвенно-климатическим условиям. Есть сведения, указывающие, что у эндофитных микроорганизмов встречаемость плазмид, ответственных за деградацию нефти, выше, чем у свободноживущих почвенных микроорганизмов (Siliciano et al., 2001; Oliveira et al., 2011). А в ризосфере растений численность микроорганизмов, способных к деструкции загрязнителя, больше, чем в отдаленных от нее слоях почвы (Binet et al., 2011; Mikolasch et al., 2015). Поэтому целесообразно при биоремедиации нефтезагрязненной территории использовать эндофитные и ризосферные бактерии как перспективные нефтедеструкторы (Ryan et al., 2006; Муратова, 2013; Чеботарь и др., 2015).

Цель работы: Провести комплексное исследование выделенных из эндо- и ризосферы растений штаммов микроорганизмов для оценки их потенциала в качестве перспективных нефтедеструкторов.

Задачи:

1. Выделить углеводородокисляющие микроорганизмы из эндосферы и ризосферы растений, произрастающих на нефтезагрязненной территории, и провести их скрининг по способности разлагать сырую нефть.
2. Определить возможные пути деструкции ароматических компонентов нефти бактериями-нефтедеструкторами.
3. Провести комплексную оценку эффективности нефтеразложения выделенными микроорганизмами: при низких положительных температурах, высокой концентрации нефти и при совместном культивировании.
4. Оценить биологические механизмы протективного действия микроорганизмов-нефтедеструкторов, способствующих лучшему выживанию

растений в условиях нефтяного загрязнения.

5. Изучить изменение биологических свойств почвы, загрязненной сырой нефтью, при внесении микроорганизмов-нефтедеструкторов.

Научная новизна работы. Из эндо- и ризосферы растений, произрастающих на территории Заларинского района Иркутской области, выделены и идентифицированы аборигенные углеводородокисляющие микроорганизмы, установлена их высокая деструктивная активность и способность выдерживать высокие концентрации нефти. Впервые были изучены свойства выделенных штаммов, не только способствующие деструкции углеводов, но и благоприятные для создания устойчивых связей с растениями. Установлено снижение негативного действия нефти на модельное растение после обработки семян бактериями *Rhodococcus erythropolis*. Это объясняется способностью данного микроорганизма к синтезу биосурфактантов, что приводит к эмульгации нефтяной пленки с корней растения. Впервые проведена комплексная оценка действия новых ассоциаций микроорганизмов-нефтедеструкторов на биологические свойства нефтезагрязненной почвы. Показано, что ускоренное разложение нефти в почве сопровождается резким усилением фитотоксичности, повышением активности оксидоредуктазных ферментов и уровня дыхания.

Практическая и теоретическая значимость работы. В работе получена коллекция ризосферных и эндосферных углеводородокисляющих микроорганизмов, активно утилизирующих нефть. Показано, что выделенные штаммы способны выживать при высоких концентрациях нефти (до 50 %). Составлена ассоциация микроорганизмов деструкторов нефти, утилизирующая нефть при низких положительных температурах, характерных для Восточно-Сибирского региона. Полученные в работе аборигенные штаммы перспективны для использования в качестве биоремедианта нефтезагрязненных территорий Сибирского региона, а также разработки на их основе микробиологического препарата.

Полученные данные расширяют современное представление об участии эндосферных и ризосферных микроорганизмов в процессе биоремедиации нефтезагрязненных почв. Впервые показано, что образование микроорганизмами биосурфактантов способствует снижению токсического действия нефти на растения путем эмульгации нефтяной пленки.

Защищаемые положения:

1. Выделены и охарактеризованы культуры микроорганизмов, способные выживать и эффективно разлагать нефть при высоких ее концентрациях и низких положительных температурах. Изучены пути деструкции ароматических компонентов нефти. При использовании ассоциаций микроорганизмов скорость деградации нефти выше, чем при использовании индивидуальных штаммов.

2. Установлено, что один из исследованных штаммов (*Rhodococcus erythropolis*) способен снижать токсическое действие нефти на модельное растение за счет синтеза биосурфактантов.

3. Показано, что внесение микроорганизмов в нефтезагрязненную почву ускоряет процесс ее биоремедиации, оказывая влияние на дыхание почвы, активность почвенных ферментов и количество микроорганизмов, а также на ее фитотоксичность.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на конференциях: VI Всеросс. с междунар. участием конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 2013), Всеросс. научной конференции с междунар. участием «Экосистемы озера Байкал и Восточной Азии» (Иркутск, 2014), 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), 20 международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пушино, 2016), Всеросс. научной конференции с междунар. участием и школе молодых ученых «Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде» (Иркутск, 2016), международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2017), международном конгрессе «Байкальские чтения» (Иркутск, 2017).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ, в том числе 3 статьи из списка ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация включает разделы «Введение», «Обзор литературы», «Объекты и методы исследования», «Результаты», «Заключение», «Выводы» «Список литературы». Работа изложена на 121 страницах, включает 12 таблиц и 23 рисунка. Список литературы состоит из 216 источников, из них 117 отечественных и 98 зарубежных работ.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и признательность научному руководителю д.б.н. Марковой Ю. А. и научному консультанту к.б.н. Беловежец Л. А. за всестороннюю помощь в проведении исследований и ценные практические советы. Особую благодарность автор выражает д.б.н. Макаровой Л. Е. и к.б.н. Соколовой Л. Г., а также сотрудникам лабораторий растительно-микробных взаимодействий, физиологии устойчивости растений, физико-химических методов исследования, физиолого-биохимической адаптации СИФИБР СО РАН, оказавших помощь при выполнении исследований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы приведены данные о свойствах нефти, ее химическом составе, особенностях загрязнения ею воды и почвы. Рассмотрены методы очистки нефтезагрязненных территорий, механизмы биодеструкции углеводородов, разложение нефти микроорганизмами при низкой положительной температуре. Приводятся факты, свидетельствующие о способности эндо- и ризосферных бактерий деградировать нефть.

Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования. Объектами исследования являлись микроорганизмы, выделенные из почвы, эндо- и ризосферы растений нефтезагрязненной территории Заларинского района Иркутской области (п. Тыреть). В 1993 г. на этой территории произошла крупная нефтяная авария, в

результате которой вытекло примерно 14 тонн нефти. Используются образцы лугово-болотной почвы и следующие виды растений: Лопух большой (*Arctium lappa*), Лапчатка гусиная (*Potentilla anserina*), Пырей ползучий (*Elytrigia repens*), Осока острая (*Carex acuta*).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Микробиологические методы. Для выделения бактерий из эндосферы растений проводили поверхностную стерилизацию растения путем обработки гипохлоритом натрия (0.7 %) в течение 10 мин. После этого растительный материал гомогенизировали и высевали в чашки Петри с МПА (мясо-пептонный агар). Чашки с агаром инкубировали при температуре 26 °С (Маркова, 2013).

Для выделения микроорганизмов из ризосферы растений корни вместе с почвой помещали в стерильную водопроводную воду, встряхивали в течение 15 мин и готовили разведения. Затем полученные суспензии высевали в накопительную среду на основе водопроводной воды следующего состава (г/л): KNO_3 - 4.0, KH_2PO_4 - 0.6, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - 1.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.8, pH-7.0, в которую в качестве единственных источников углерода добавляли гексан, а также автомобильное масло, отработанное автомобильное масло и бензин в концентрации 2 % (V/V). Микроорганизмы инкубировали 30 сут в аэрируемых условиях на роторном шейкере (130 об/мин) при температуре 26 °С. Для получения чистых культур углеводородокисляющих микроорганизмов использовали агаризованную среду МПА.

Для выявления наиболее активных деструкторов нефти использовали жидкую минеральную среду 8E (Willumsen et al., 2007) с добавлением 2 % сырой нефти (V/V). Культивирование проводили в течение 2-х мес при температуре 26 °С.

Для определения способности бактерий утилизировать нефть при различных ее концентрациях в среде также использовали жидкую минеральную среду 8E, содержащую 5, 10, 15, 20, 50 % нефти (V/V). Культивирование проводили в колбах при 26 °С. Через 2 мес определяли убыль нефти гравиметрическим методом (Другов и др., 2014).

Для изучения способности штаммов к деструкции нефтепродуктов (тетрадекана, дизельного топлива) на твердой минеральной среде использовали минеральную среду 8E с добавлением агара, куда вносили нефтепродукты в разных концентрациях 1, 2.5, 5, 7.5, 10.0 % (V/V). Через 10 сут визуально определяли наличие роста культур.

Изучение разложения нефти ассоциациями микроорганизмов проводили в жидкой минеральной среде 8E с 10 % (V/V) нефти при температуре 26 °С.

Изучение способности микроорганизмов разлагать нефть при низких положительных температурах проводили в жидкой минеральной среде 8E, содержащей нефть в концентрации 10 % (V/V). Культивирование осуществляли в течение 2 мес при температуре 4 °С и 10 °С, убыль нефти определяли гравиметрическим методом (Другов и др., 2014).

Изучение морфологических признаков, физиолого-биохимических свойств выделенных культур проводили с применением стандартных тест-систем (Нетрусов, 2005).

Учет численности микроорганизмов в почве проводили методом предельных разведений путем посева почвенных суспензий на агаризованные питательные

среды МПА, Чапека и Сабуро (Нетрусов, 2005).

Образование биосурфактантов микроорганизмами определяли косвенными методами: по снижению поверхностного натяжения (Ягофарова и др., 2012), показателю гидрофобности (Серебрякова и др., 2002), появлению эмульгирующей активности культур (Cooper et al., 1987).

2.2.2 Молекулярно-генетические методы. Геномную ДНК бактерий выделяли с помощью коммерческого набора «Bacteria DNA Preparation Kit» (Jena Biosciences, Германия). Для амплификации гена 16S рРНК использовали универсальные зубактериальные праймеры 8f (5'-agagtttgatcctggctcag-3') и 1492r (5'-ggttaccttgtagactt-3'). Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1 % агарозном геле с использованием 1×ТАЕ-буфера. Для очистки целевого продукта ПЦР использовали коммерческий набор DNA Extraction kit (Thermo Scientific, Германия). Секвенирование продуктов амплификации проводили в институте Микробиологии НАН Беларуси (г. Минск). Сравнительный анализ гомологии секвенированной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и референтных последовательностей проводили с использованием базы данных GenBank и программы Nucleotide BLAST (Матвеева, 2011, Григорьева, 2013).

2.2.3 Химические методы. Состав низкомолекулярных фенольных соединений (ФС) определяли в экстрактах, полученных из культуральных жидкостей бактерий при помощи этилацета и перерастворенных в небольшом количестве метанола. При этом бактерии выращивали в минеральной среде 8Е с нефтью 10 % (V/V). Состав ФС определяли методом ВЭЖХ на жидкостном микроколоночном хроматографе «Миличром А-02». Контролем служила минеральная среда без добавления бактерий.

Активность каталазы определяли перманганатометрически, полифенолоксидазы и пероксидазы йодометрически через 5 и 60 сут (Хазиев, 1990).

2.2.4 Методы биотестирования. Для изучения комплексного взаимодействия растения, эндо- и ризосферных микроорганизмов были использованы семена редьки масличной *Raphanus sativus* var. *oleiferus* (L.) Sazonova & Stank селекционный образец СИФИБР СО РАН «Линия ИрГСХА». Выбор объекта был обусловлен хорошей всхожестью редьки при различных условиях выращивания, высокой скоростью прорастания и коротким периодом посев-всходы. В то же время проростки редьки масличной весьма чувствительны к нефтяному загрязнению. Семена предварительно стерилизовали, и замачивали на 24 ч в суспензии бактерий (10^7 КОЕ/мл). Контролем служили растения, семена которых были замочены в стерильной водопроводной воде. Затем семена высевали в контейнеры с увлажненным стерильным песком с добавлением нефти до концентрации 2 % от его веса. Анализировали всхожесть, массу и длину надземной части растения и корней через 14 сут.

Определения эмиссии CO₂ проводили адсорбционным методом *in exp* 1 раз в неделю (Пуртова и др., 2013).

Определение фитотоксичности нефтезагрязненной почвы проводили методом проростков 1 раз в две недели. Использовали семена редиса (*Raphanus sativus*, сорт Дуро краснодарское), пшеницы (*Triticum durum*, сорт Гром), гороха (*Pisum sativum*, сорт Сахарный стручок). Всхожесть семян рассчитывали как отношение числа

проросших семян к общему числу семян по стандартной методике через 3 сут (Экологическое почвоведение, 2002).

Определение содержания остаточной нефти в почве проводили гравиметрическим методом через 60 сут (Другов, 2014).

2.2.5 Модельный лабораторный эксперимент с нефтезагрязненной почвой и внесением ассоциаций микроорганизмов. Эксперимент проводили с использованием серой лесной почвы, взятой на территории СИФИБР СО РАН. Почву искусственно загрязняли нефтью в концентрации 10 % (V/V), затем инокулировали суспензией микроорганизмов-нефтедеструкторов с титром 10^7 КОЕ/мл. Инкубацию почвы проводили в течение 60 сут при температуре 26 °С в регулируемой климатической камере Plant Master.

Варианты эксперимента:

1. Незагрязненная почва (Контроль 1)
2. Загрязненная нефтью почва (без бактерий) (Контроль 2)
3. Загрязненная почва + *Rhodococcus erythropolis* (108)
4. Загрязненная почва + *Acinetobacter guillouiae* 1 (112)
5. Загрязненная почва + *Acinetobacter guillouiae* 2 (114)
6. Загрязненная почва + *Rhodococcus erythropolis* (108) + *Acinetobacter guillouiae* 1 (112) + *Acinetobacter guillouiae* 2 (114).

Статистическая обработка данных выполнена на базе программного обеспечения Statistica 6.0. На рисунках и в таблицах приведены средние показатели и стандартные ошибки к ним, которые получены по данным из 3-х независимых экспериментов. Для оценки достоверности различий использовали критерий Манна-Уитни, при уровне значимости $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Характеристика исследуемых микроорганизмов. Из эндо- и ризосферы исследуемых растений и почвы было выделено 60 культур микроорганизмов, потенциально обладающих углеводородокисляющими свойствами. При исследовании способности этих микроорганизмов разлагать сырую нефть в жидкой минеральной среде показана различная степень ее утилизации за 2 мес культивирования (табл. 1).

Таблица 1

Биотрансформация нефти бактериями в жидкой минеральной среде 8Е с 2% нефти через 60 сут культивирования

Степень деструкции	Убыль нефти, массовые %	Штаммы
Слаборазрушающие	5-10	59, 111, 70, 71, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 75, 84, 85, 87, 93, 94, 95
	15-20	83, 91, 129, 120, 133, 77, 78, 104, 131, 89, 74, 116, 106, 72, 73
Среднеразрушающие	20-30	98, 99, 100, 121, 124, 130, 132, 82, 139, 138
	30-35	81, 88, 92, 94, 96, 97, 105, 122, 76, 137, 60, 86
Сильноразрушающие	40-45	102, 109
	45-54	108, 112, 114, 90

Для дальнейших исследований были взяты шесть штаммов микроорганизмов наиболее активных в отношении разложения углеводородов нефти.

При визуальном исследовании микроорганизмы (102, 108, 109, 90) разлагали нефть с образованием эмульсии после 60 сут экспозиции (рис. 1).

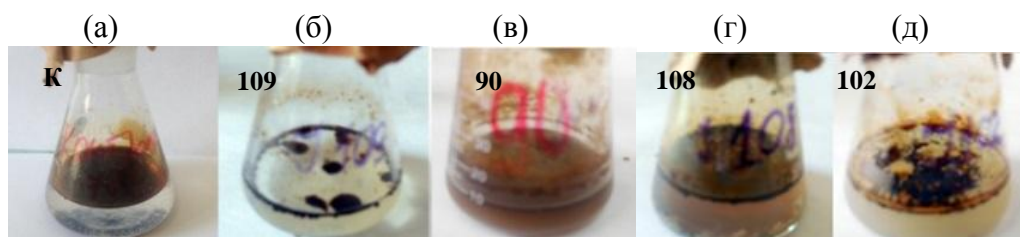


Рис. 1. Дегradация углеводородов нефти в жидкой минеральной среде после 60 сут культивирования: (а) - контроль; (б) - добавление в среду штаммов 109; (в) - 90; (г) - 108; (д) - 102

При культивировании штаммов 112 и 114 не происходило эмульгирование нефти, но наблюдалось истончение нефтяной пленки, ее обесвечивание. Культуральная жидкость становилась мутной за счет увеличения биомассы бактерий, отмечалось выраженное газообразование (рис. 2).

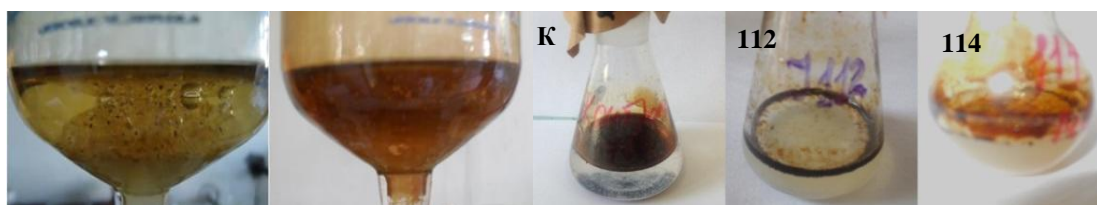


Рис. 2. Образование газов штаммом 112 и 114 при разложении сырой нефти после 60 сут культивирования

Определение способности выбранных культур к деструкции нефтепродуктов на твердой минеральной среде показало активный рост всех исследованных штаммов как на тетрадекане, так и на дизельном топливе при различных их концентрациях в среде. Особенно активный рост показали штаммы 108, 112, 114.

На следующем этапе оценивали способность выбранных штаммов расти и деструктировать нефть в присутствии ее высоких концентраций в среде. Было показано, что при увеличении концентрации в среде нефти скорость ее дегradации снижалась. Тем не менее, убыль нефти при концентрации 20 % составила от 7 до 18 % (V/V), а при содержании нефти в питательной среде 50 %, убыль достигала 10 % (штамм 114) (табл. 2).

При исследовании деструкции нефти ассоциациями микроорганизмов показано, что при температуре 26 °С убыль нефти достоверно отличалась от таковой в случае применения монокультур. При оценке деструктивного потенциала штаммов в отношении углеводородов нефти при низких положительных температурах установлено, что при температуре 4 °С разложение нефти практически не происходило. Тогда как при 10 °С степень деструкции ассоциацией 112 и 114 культур составила 15 % за 2 мес культивирования (табл. 3). При совместном действии этих микроорганизмов отмечено разрушение нефтяной пленки с образованием мелких капель нефти.

Таблица 2

Убыль нефти (в %) при разных её концентрациях в жидкой минеральной среде в результате деградации штаммами 90, 102, 108, 109, 112, 114 в течение 60 сут, при температуре 26 °С с вычетом абиотической убыли

Степень биодegradации нефти, %						
Концентрация нефти, % (v/v)	Штамм					
	90	102	108	109	112	114
5	26±0.9	22±2.2	30±1.5	24±1.9	35±0.8	32±1
10	15±1.7	13±1.2	11±0.8	12±1.4	28±2	23±1.7
15	12±0.9	10±1.3	10±1.1	10±0.8	24±1.4	22±1.4
20	9±1.3	7±0.8	7±0.4	8±1.2	16±1.5	18±1.5
50	5±0.7	4±0.8	5±1	6±1.2	8±1.4	10±1

Таблица 3

Разложение нефти ассоциациями микроорганизмов через 60 сут культивирования при различной температуре, концентрация нефти в среде 10 %

Температура культивирования	Ассоциации штаммов	Степень деструкции нефти, %
4 °С	108+114	2±1.5
	108+112	1,5±2.0
	112+114	3,4±0.5
	108+112+114	1,3±2.1
10 °С	108+114	5±0.2
	108+112	7±0.5
	112+114	15±0.2
	108+112+114	4,4±0.8
26 °С	108+114	26±1.5*
	108+112	30±3.5*
	112+114	32±1.0*
	108+112+114	25±3.8*

Примечание: звездочкой показаны достоверные различия показателя от монокультуры, при уровне значимости $p \leq 0,05$

Культуральные, морфологические, физиолого-биохимические признаки, а также секвенирование амплифицированных фрагментов генов 16S рРНК и анализ полученных последовательностей показали, что выбранные нефтеокисляющие штаммы принадлежат к родам *Rhodococcus* (108), *Pseudomonas* (90, 102, 109), *Acinetobacter* (112, 114). Видовые названия приводятся в таблице 4.

Идентификация выделенных штаммов

Номер образца	Идентифицированный род (и виды)	% гомологии
102	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	99%
90	<i>Pseudomonas</i> sp.	97%
109	<i>Pseudomonas</i> sp.	99%
112	<i>Acinetobacter guillouiae</i> 1	98%
114	<i>Acinetobacter guillouiae</i> 2	99%
108	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	98%

3.2 Изучение путей деструкции ароматических соединений нефти бактериями-нефтедеструкторами. Для более эффективного использования микроорганизмов-деструкторов при биоремедиации, необходимо понимание путей, по которым они разрушают углеводороды нефти. Среди всех компонентов нефти наиболее токсичной и интересной с точки зрения микробной деструкции является ароматическая фракция.

В настоящее время известно о различных путях деструкции ароматических соединений нефти в зависимости от вида микроорганизма-деструктора. Однако существуют два обязательных интермедиата, свидетельствующих о расщеплении ароматических соединений. Одним из них является пирокатехин, ключевой интермедиат разложения соединений фенантренового и нафталинового рядов. Он очень быстро расщепляется до цис-цис муконовой кислоты и 2 гидроксимуконового полуальдегида. Также с образованием пирокатехина деструктируются фенолы, антрацен, фенантрен. Вторым ключевым интермедиатом является протокатеховая кислота (протокатехат) и продукты ее расщепления карбокси-цис-цис муконовая или 3 оксиадипиновая кислота в зависимости от мета- или орто- раскрытия ароматического кольца. Еще одним интермедиатом, характерным для расщепления ароматических соединений является салициловая кислота, предшествующая образованию пирокатехина или гентезиновой кислоты.

В результате были установлены основные метаболиты, образующиеся при разложении ароматических соединений исследуемыми штаммами бактерий (табл. 5).

Показано, что все изученные штаммы были способны эффективно разлагать ароматические соединения с образованием ключевого интермедиата пирокатехина, а три из них, штаммы 90, 108 и 112, использовали оба основных пути разрушения ароматических углеводородов – через пирокатехин и через протокатехат (рис. 3). Установлено, что штаммы 112 и 114, относящиеся к одному виду *Acinetobacter guillouiae* используют различные пути деструкции ароматических соединений.

Состав ароматических соединений, обнаруженных в культуральных жидкостях различных штаммов бактерий в присутствии нефти

Соединение	Штаммы бактерий						
	108	112	114	90	102	109	Конт роль
Бензойная к-та	+	+	+	+	+	+	+
<i>n</i> -Оксибензойная к-та	+	+	+	+	-	-	-
Протокатеховая к-та	+	+	-	+	-	-	-
Пирокатеховая к-та	-	+	-	-	-	-	-
Ванилиновая к-та	-	Сл.	+	+	-	-	-
Сиреневая к-та	+	+	-	-	-	-	-
Салициловая к-та	+	+	+	+	+	+	-
Гентизиновая к-та	-	Сл.	+	-	+	-	-
Коричная к-та	+	+	+	+	+	+	-
<i>n</i> -Кумаровая к-та	Сл.	+	+	+	+	+	-
Феруловая к-та	Сл.	-	-	-	-	-	-
Коричный спирт	+	-	-	+	-	+	+
Коричный альдегид	+	+	-	+	-	+	+
<i>o</i> -Ванилин	+	+	+	+	+	+	-
Пирокатехин	+	-	+	-	-	-	-
Максимальное число компонентов	30 (8)	15 (8)	18 (6)	12 (8)	15 (6)	13 (8)	11(8)

* Указано максимальное число соединений со временем выхода от 7 до 17 мин и поглощением в области 250–300 нм в соответствующий период роста (указан в скобках).
Сл. – следы

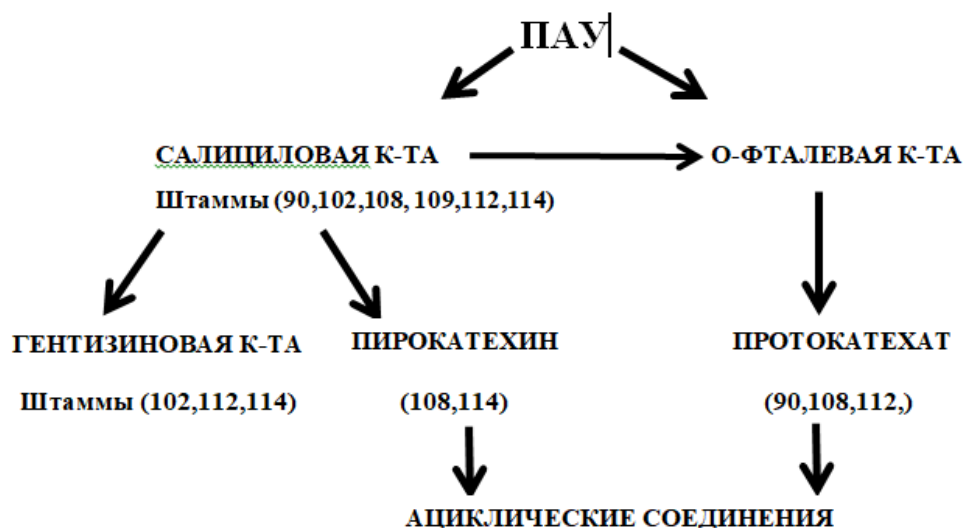


Рис. 3. Пути биодegradации ароматических соединений нефти бактериями-нефтедеструкторами

3.3 Выживаемость растений в загрязненных почвах при внесении исследуемых ассоциаций. Важным моментом до этапа промышленного использования штаммов-нефтедеструкторов в процессах очистки почв от нефтезагрязнений является получение данных о характере воздействия изучаемых

штаммов на растения. В связи с этим следующим этапом нашей работы было изучение влияния бактерий-нефтедеструкторов, выделенных из эндо- и ризосферы растений, на прорастание семян и развитие растений в условиях нефтезагрязнения.

Показано, что при внесении сырой нефти в стерильный песок в концентрации 2 % наблюдалось ингибирующее влияние на прорастание и развитие растений редиса. Всхожесть снижалась на 50 %, длина подземной и надземной части растения и масса проростков на 60 %.

При инокуляции семян исследуемыми штаммами (90, 102, 108, 109, 112, 114) было установлено достоверное влияние на рост и развитие редьки в присутствии нефти только одного из шести использованных нами штаммов: *Rhodococcus erythropolis* (штамм 108). При обработке семян данным микроорганизмом всхожесть семян редьки масличной в условиях нефтезагрязнения повышалась на 25 % относительно контроля (рис. 4а), длина корня увеличивалась на 50 % (рис. 4б), высота надземной части и ее масса на 40 % (рис. 4б, в). Это свидетельствует о снижении ингибирующего действия нефти на растение.

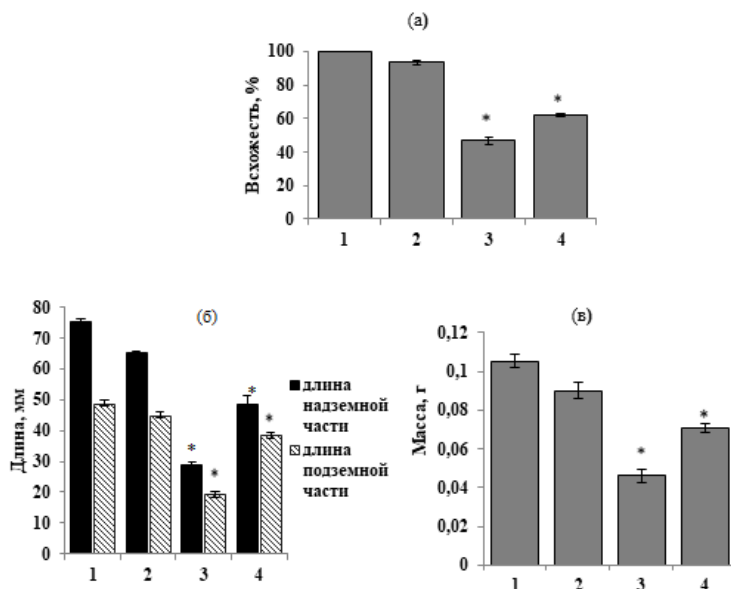


Рис. 4. Влияние инокуляции бактерией на морфологические параметры редьки масличной при добавлении нефти на 14 сут: (а) всхожесть, (б) длина надземной части, длина подземной части, (в) масса проростков. (1) контроль без добавления нефти и бактерий, (2) *Rhodococcus erythropolis* (108) без нефти, (3) нефть без бактерий, (4) *Rhodococcus erythropolis* (108) с нефтью, n=15

Примечание: звездочкой показаны достоверные различия показателя от контрольного (нефть без бактерий), при уровне значимости $p \leq 0,05$

Внешний вид растений, выросших из семян обработанных данным штаммом и необработанных контрольных представлен на рис. 5.

Возможным механизмом снижения ингибирующего действия нефти на растение у штамма может быть синтез поверхностно-активных веществ (биосурфактантов). Нами установлено, что из всех исследуемых штаммов-нефтедеструкторов только штамм 108 обладает эмульгирующей активностью. Показатель гидрофобности клеточной стенки у этого штамма составлял 78 %.



Рис. 5. Развитие редьки масличной при добавлении нефти и инокуляцией семян штаммом *Rhodococcus* (108) на 14 сут: (1) контроль без добавления нефти и бактерий, (2) *Rhodococcus erythropolis* (108) без нефти, (3) *Rhodococcus erythropolis* (108) с нефтью, (4) нефть без бактерий

Все вышесказанное позволило нам предположить, что одним из возможных механизмов положительного влияния штамма 108 на выживаемость растений в условиях нефтезагрязнения может быть эмульгация нефтяной пленки с поверхности корней. Для подтверждения этой гипотезы было проведено исследование зоны корневых волосков с помощью световой микроскопии (рис. 6). Установлено, что у растений, выращенных в условиях нефтезагрязнения, эта зона была покрыта нефтяной пленкой, количество корневых волосков было незначительно. Тогда как у растений, выросших из семян, обработанных 108 штаммом нефтяная пленка на поверхности корня не наблюдалась, а развитие корневых волосков практически не отличалось от их развития у контрольных растений, выращенных без внесения нефти и обработки бактериями. У инокулированных растений в области корневых волосков наблюдались скопления микробных клеток, вероятно, адсорбирующихся на корнях.

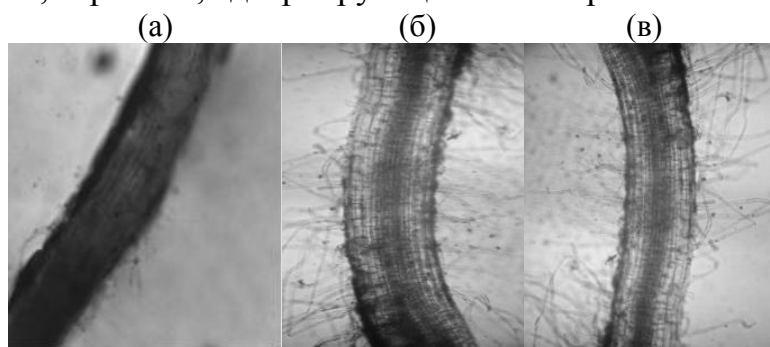


Рис. 6. Развитие корневой системы редьки масличной при добавлении нефти: (а) - нефть без бактерий, (б) - нефть и добавление штамма *Rhodococcus erythropolis* (108), (в) - контроль без добавления нефти и бактерий, х 40

Таким образом, при изучении влияния шести бактерий-нефтедеструкторов, выделенных из эндо- и ризосферы растений на развитие и рост редьки масличной (*Raphanus sativus* var. *oleiferus*) в условиях нефтезагрязнения, установлено, что только один штамм, относящийся к роду *Rhodococcus*, проявил наилучшие фитозащитные свойства, снижая негативное влияние нефти.

3.4 Изменение биологических свойств почвы, загрязненной сырой нефтью при внесении ассоциаций микроорганизмов. Оценка перспективности

использования выделенных аборигенных штаммов для восстановления нефтезагрязненных почв стала следующим этапом нашей работы. В условиях модельного эксперимента изучали показатели биологической активности почвы в вариантах с внесением нефти и выделенных нами штаммов. Для характеристики биологической активности использовали следующие интегральные показатели: фитотоксичность почвы, изменение ферментативной и дыхательной активности почвы и общей численности почвенной микрофлоры (Плешакова и др., 2011; Сулейманов и др., 2012; Кириенко др., 2015).

Результаты показали, что проявление фитотоксичности почвы зависело от срока загрязнения. Максимальный негативный эффект был больше выражен в первые дни после внесения нефти. Наиболее чувствительными к воздействию нефти оказались семена редиса. Резкое снижение их всхожести (на 85 %) происходило через две недели после внесения сырой нефти в почву (рис. 7). Во всех последующих измерениях всхожесть семян практически не отличалась от контроля. Возможно, в первые две недели эксперимента токсический эффект оказала быстро разлагаемая фракция нефти.

Выделенные штаммы микроорганизмов-нефтедеструкторов в основном способствовали снижению фитотоксичности почвы на начальном этапе восстановления. Наиболее эффективной оказалась обработка почвы штаммом *Rhodococcus erythropolis* (108). В варианте с внесением штамма *Acinetobacter guillouiae* 1 (112), напротив, фитотоксичность почвы усиливалась.

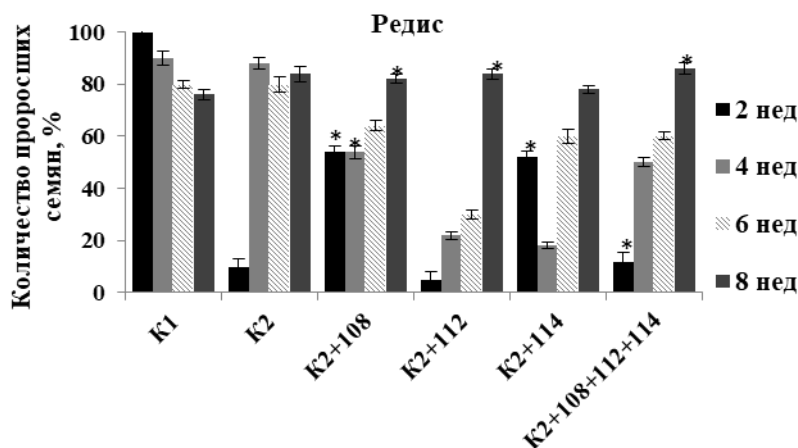


Рис. 7. Определение фитотоксичности почвенного раствора: K1 - незагрязненная почва, K2 - почва, загрязненная нефтью без бактерий
Примечание: звездочкой показаны достоверные различия показателя от контроля 2, при уровне значимости $p \leq 0,05$

Для оценки эффективности процессов биоремедиации почвы использовали показатели активности основных окислительно-восстановительных ферментов: пероксидазы, каталазы и полифенолоксидазы. Установлено, что незагрязненная почва практически не обладала пероксидазной активностью, а активность полифенолоксидазы и каталазы находилась на среднем уровне (рис. 8). Через пять сут после внесения нефти в почву активность исследуемых ферментов резко увеличивалась, что, вероятно, связано с активизацией почвенной микрофлоры, вынужденной в короткие сроки нейтрализовать большое количество токсичных соединений. Через два месяца эксперимента активность ферментов снижалась.

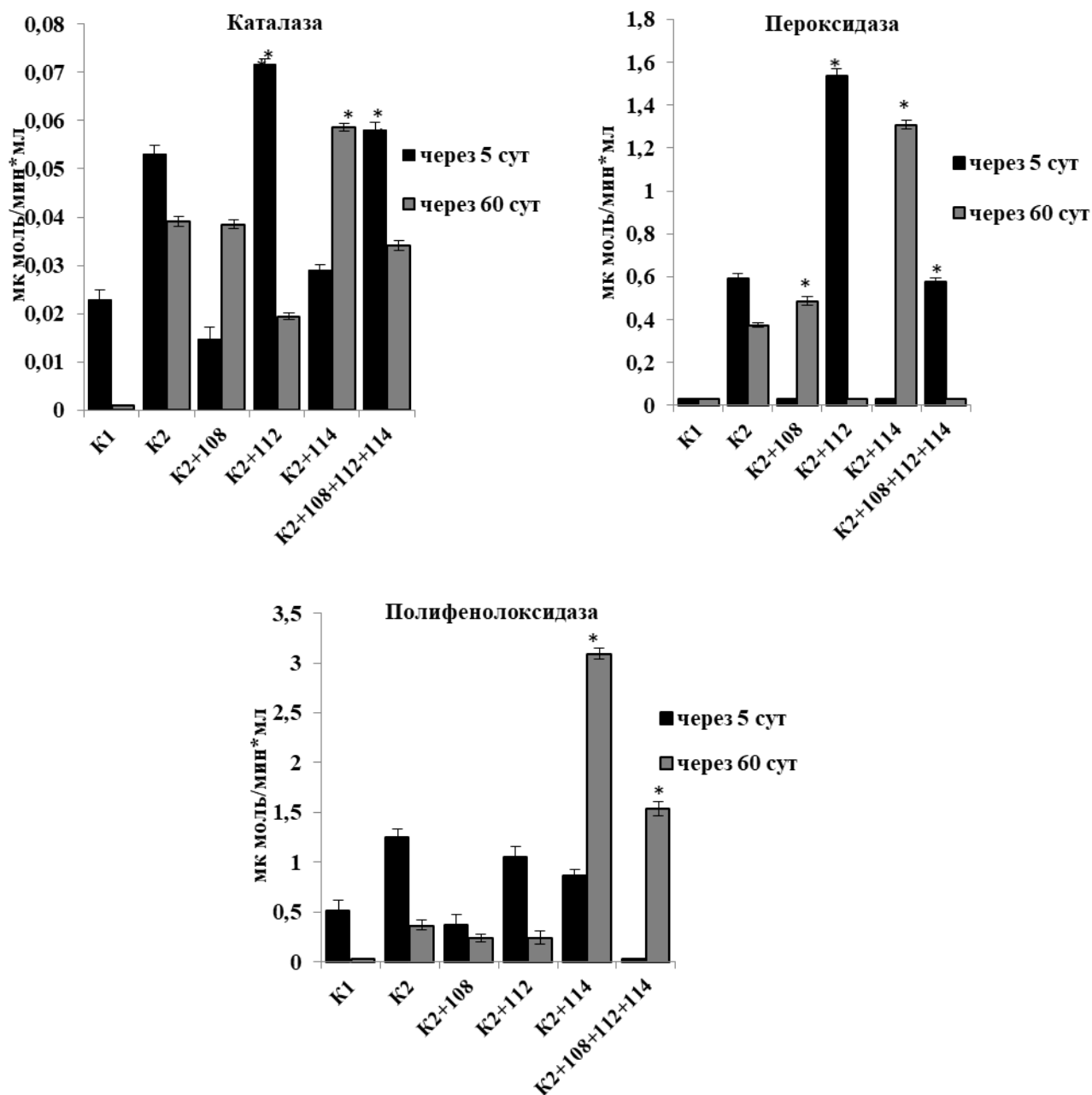


Рис. 8. Определение ферментативной активности почвы: K1 - незагрязненная почва, K2 - почва, загрязненная нефтью без бактерий
Примечание: звездочкой показаны достоверные различия показателя от контроля 2, при уровне значимости $p \leq 0,05$

Действие внесенных в почву штаммов микроорганизмов зависело от их видовой специфичности. Внесение штамма *Acinetobacter guillouiae* 1 (112) способствовало усилению каталазной и пероксидазной активности на начальных этапах эксперимента. Применение штамма *Acinetobacter guillouiae* 2 (114) усиливало активность всех ферментов, напротив, к концу эксперимента. Соотнесение активности ферментов с фитотоксичностью свидетельствует о сопряженности процессов происходящих в почве. Максимальная ферментативная активность соответствовала периоду максимальной фитотоксичности почвы.

Структура микробного сообщества незагрязнённой почвы была представлена большей частью бактериями, затем грибами и в меньшей степени актиномицетами. Загрязнение почвы нефтью приводило к увеличению ($p \leq 0,05$)

всех перечисленных групп микроорганизмов уже через пять суток после внесения, что можно связывать с активизацией аборигенной углеводородокисляющей микрофлоры. Через два месяца численность гетеротрофных бактерий и грибов достоверно снижалась, тогда, как количество актиномицетов возросло. Негативные перестройки в структуре почвенного сообщества свидетельствуют об его переходе в зону стресса (Гузев, Левин, 1991). Внесение в загрязненную почву исследуемых штаммов микроорганизмов способствовало изменению микробного спектра, связанную преимущественно со стимулированием роста бактерий, за исключением штамма 108, где наблюдался рост грибов. При добавлении в загрязненную среду консорциума микроорганизмов, микробный спектр практически не отличался от незагрязненной почвы. Это можно рассматривать как восстановление почвенного микробного сообщества и выход его из зоны стресса.

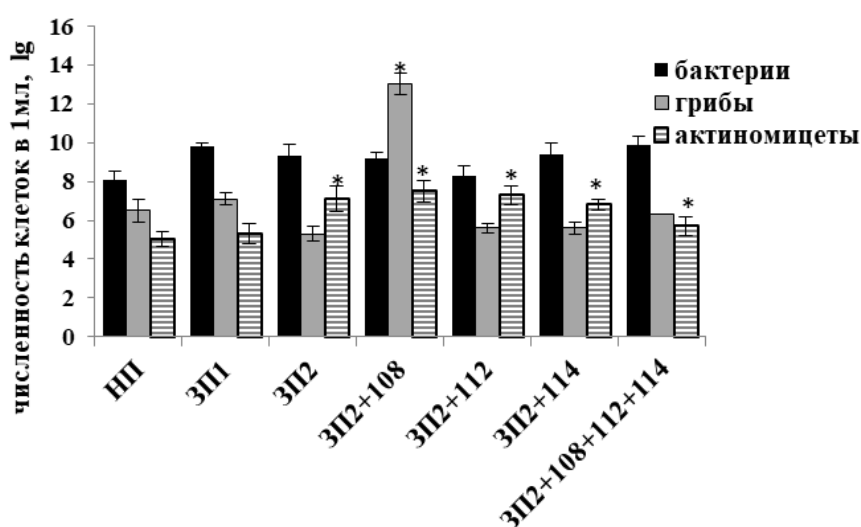


Рис. 9. Исследование микробного спектра почвы: НЗ - незагрязнённая почва, ЗП1 - загрязнённая нефтью (через 5 сут), ЗП2 - загрязнённая почва через 60 сут без бактерий
Примечание: звездочкой показаны достоверные различия показателя от ЗП1, при уровне значимости $p \leq 0,05$

Интенсивность выделения CO_2 , являющегося конечным продуктом разложения нефти, позволила оценить процессы ее деградации в почве, в том числе при биоремедиации. Показано, что на протяжении всего эксперимента в загрязненной нефтью почве уровень выделения CO_2 был выше, чем в незагрязненной, по-видимому, за счет активизации аборигенной углеводородокисляющей микрофлоры.

Внесение выделенных штаммов в основном усиливало скорость эмиссии углекислого газа. Наибольшую интенсивность дыхания показали штаммы *Rhodococcus erythropolis* (108), *Acinetobacter guillouiae* 2 (114) и консорциум микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis* + *Acinetobacter guillouiae* 1 + *Acinetobacter guillouiae* 2 (108+112+114).

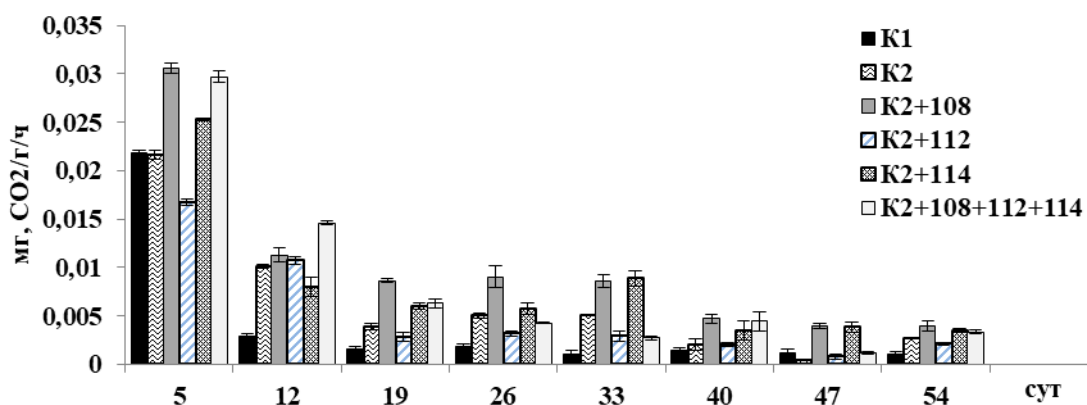


Рис. 10. Интенсивность эмиссии CO₂: K1- незагрязненная почва, K2-внесение нефти без бактерий

Одним из основных показателей очищения почв от нефтезагрязнения является остаточное содержание нефти. Показано, что в загрязненной почве его величина через 60 сут эксперимента составила около 60 %. Внесение исследуемых штаммов в загрязненную почву способствовало ускорению разложения нефти в почве. При внесении штамма *Rhodococcus erythropolis* остаточное содержание нефти составило 35 %, штамма *Acinetobacter guillouiae* 2 - 34 %, *Acinetobacter guillouiae* 1 - 32 %, консорциума микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis* + *Acinetobacter guillouiae* 1 + *Acinetobacter guillouiae* 2 (108+112+114) - 38 % (рис. 11).

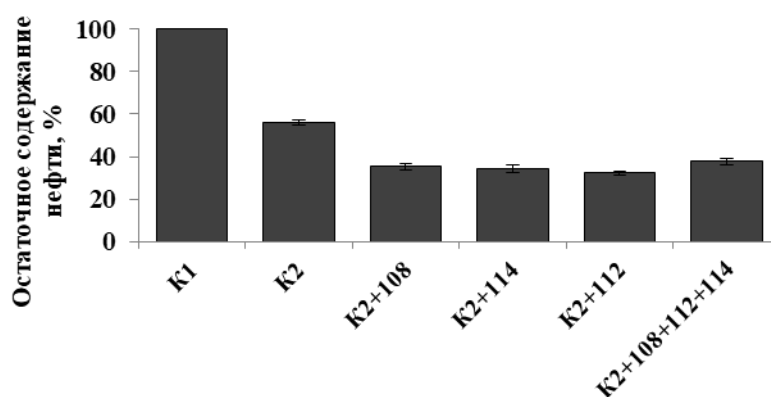


Рис. 11. Остаточное содержание нефти в почве за 60 сут эксперимента: K1 - исходное содержание нефти, K2 - внесение нефти в почву без бактерий

Проведенные исследования показали, что наиболее перспективными микроорганизмами деструкторами для восстановления загрязненной нефтью серой лесной почвы являются штаммы *Rhodococcus erythropolis* (108), *Acinetobacter guillouiae* 2 (114) и консорциум микроорганизмов *Rhodococcus* + *Acinetobacter*1 + *Acinetobacter* 2 (108+112+114).

ВЫВОДЫ

1. Из эндо- и ризосферы растений, произрастающих на нефтезагрязненной территории Заларинского района Иркутской области, выделено 60 культур углеводородокисляющих микроорганизмов. Путем скрининга отобрано 6 наиболее

перспективных деструкторов нефти, которые за 2 мес культивирования в жидкой минеральной среде утилизировали около 50 % нефти.

2. Все исследованные штаммы бактерий разлагают ароматические компоненты нефти по наиболее распространенному среди микроорганизмов метаболическому пути, интермедиатом которого являлся пирокатехин, а штаммы *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus erythropolis* и *Acinetobacter guillouiae* 1 дополнительно используют альтернативный путь окисления, протекающий с образованием протокатеховой кислоты.

3. Все исследованные штаммы способны к эффективной деструкции нефти при высоких ее концентрациях в питательной среде. При исходной концентрации нефти 50 % наибольшую эффективность показал штамм *Acinetobacter guillouiae* 2. Убыль нефти составила 10 %.

4. Путем комбинирования наиболее активных штаммов подобраны ассоциации микроорганизмов, проявляющие высокую нефтеразрушающую активность при температуре +10 °С и 26 °С. Наибольшую эффективность показала ассоциация микроорганизмов *Acinetobacter guillouiae* 1+ *Acinetobacter guillouiae* 2.

5. Установлено, что выделенный из ризосферы растений *Rhodococcus erythropolis* (штамм 108) наряду с высокой толерантностью к нефтепродуктам способен снижать негативное действие нефти на модельное растение (*Raphanus sativus* var. *oleiferus*) за счет синтеза биосурфактантов.

6. Наиболее перспективными с точки зрения восстановления нефтезагрязненных почв являются штаммы родов *Rhodococcus* (108), *Acinetobacter* 2 (114), а также их ассоциация с *Acinetobacter* 1 (112). В присутствии этих микроорганизмов повышается эффективность разложения углеводов нефти в загрязненной почве, увеличивается активность почвенных оксидоредуктаз (до 8 раз), усиливается интенсивность дыхания (до 74 %), снижается токсическое действие углеводов нефти на растения (до 1,5 раз).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из перечня ВАК:

1. **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. – С. 138-142.

3. 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. 76-81.

3. **Третьякова М. С.** Способность бактерий - нефтедеструкторов снижать токсическое действие нефти на растение / **М. С. Третьякова**, Л. А. Беловежец, Ю. А. Маркова, Л. Е. Макарова // Агрохимия. – 2017. – № 12. – С. 46-51.

Статьи в прочих журналах:

4. **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. – 2015. – № 1. – С. 251-255.

5. 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. – 2017. № 2. – С. 32-37.

6. **Третьякова М. С.** Угледородоокисляющие микроорганизмы, выделенные из эндо- и ризосферы растений / М. С. Третьякова, Л. А. Беловежец, Ю. А. Маркова, Л. Е. Макарова // Актуальная биотехнология. – 2017. – № 2 (21). – С. 134-135.

Материалы конференций:

7. **Третьякова М. С.** Влияние бактерий ассоциированных с растениями на рост и развитие редьки масличной в присутствии нефтепродуктов / **М. С. Третьякова**, Ю. А. Маркова, Е. Г. Рихванов, Н. В. Дорофеев // Материалы VI Всероссийского с межд. участием конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013». Иркутск, 2013. – С. 116-117.

8. **Третьякова М. С.** Деструкция углеводов нефти бактериями, ассоциированными с растениями / **М. С. Третьякова**, Л. А. Беловежец, Ю. А. Маркова // Экосистемы озера Байкал и Восточной Азии: Материалы Всероссийской научной конференции с межд. участием. Иркутск, 2014. – С. 162-163.

9. **Беловежец Л. А.** Новые перспективные штаммы бактерий-нефтедеструкторов, выделенные из эндо- и ризосферы растений / Л. А. Беловежец, **М. С. Третьякова**, Л. Е. Макарова, Ю. А. Маркова // Материалы IX межд. научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты». Минск, 2015. – С. 173-174.

10. **Третьякова М. С.** Культуральные особенности штаммов-нефтедеструкторов / **М. С. Третьякова**, Л. А. Беловежец, Ю. А. Маркова, Е. М. Глушень, Н. Г. Клишевич, Г. И. Новик, А. В. Сидоренко // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии». Иркутск, 2015. – С. 179-183.

11. Беловежец Л. А. Скрининг бактерий-нефтедеструкторов / Л. А. Беловежец, **М. С. Третьякова**, Ю. А. Маркова // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии». Иркутск, 2015. – С. 151-154.

12. **Третьякова М. С.** Перспективные штаммы-нефтедеструкторы / **М. С. Третьякова**, Л. А. Беловежец, Ю. А. Маркова // Материалы VIII Всероссийского с межд. участием конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2015». Новосибирск, 2015. – С. 27.

13. **Третьякова М. С.** Изучение взаимодействия угледородоокисляющих эндофитных и ризосферных бактерий с растениями / **М. С. Третьякова**, Л. А. Беловежец, Ю. А. Маркова, Е. Г. Рихванов, Н. В. Дорофеев // Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с межд. участием «Технологии и Оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности». Бийск, 2016. – С. 307-310.

14. **Третьякова М. С.** Возможные пути деструкции ароматической составляющей нефти некоторыми видами бактерий - нефтедеструкторов выделенными из эндо и ризосферы растений / **М. С. Третьякова**, Л. А. Беловежец, Л. Е. Макарова, Ю. А. Маркова // Материалы межд. Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология-наука 21 века». Пущино, 2016. – С. 51-52.

15. **Третьякова М. С.** Изучение биодegradации нефти бактериями, выделенными из эндо и ризосферы растений / **М. С. Третьякова**, Л. А. Беловежец, Ю. А. Маркова // Материалы Всероссийской научной конференции с межд. участием и школы молодых ученых «Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде». Иркутск, 2016. – С. 230-231.

16. Беловежец Л. А. Новые перспективные микроорганизмы-нефтедеструкторы, выделенные из эндо- и ризосферы растений / Л. А. Беловежец, **М. С. Третьякова**, Ю. А. Маркова, Л. Е. Макарова // Материалы межд. конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, 2017. – С. 467-468.

ТРЕТЬЯКОВА Марина Сергеевна

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭНДО- И РИЗОСФЕРНЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЗАГРЯЗНЕННЫХ
НЕФТЬЮ ПОЧВ

Автореф. дис. на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Подписано к печати 19.03.2018 г.
Формат 60×84/16. Объем 1,4 п.л. Тираж 150 экз. Заказ № 802.
Издательство Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН.
664033 г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 1.

