ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИРКУТСКИЙ ИНСТИТУТ ХИМИИ ИМ. А. Е. ФАВОРСКОГО СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Беловежец Людмила Александровна

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

Специальность 03.02.08 – экология (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант

доктор биологических наук

Маркова Юлия Александровна

Иркутск – 2020

Содержание

ВВЕДЕНИЕ 4

Глава 1. Обзор литературы 14

1.1 Экологические функции почв и их изменения при антропогенном загрязнении 14

1.1 Характеристика субстратов, являющихся опасными загрязнителями почвенных экосистем и используемых для биотрансформации 19

1.1.1 Древесина 19

1.1.2 Нефть и нефтепродуктов 21

1.4 Скрининг микроорганизмов по способности трансформировать органические субстраты 23

1.5 Процессы, происходящие при трансформации органических субстратов 27

1.5.1 Компостирование лигноцеллюлозных отходов 27

1.5.2 Микробная трансформация нефти 30

1.6 Характеристика микроорганизмов, способных трансформировать субстраты, и их ферментативная активность 46

1.6.1 Основные виды микроорганизмов, участвующих в разложении субстратов 46

1.6.2 Ферменты, участвующие в разложении органических субстратов 50

1.7 Биологически активные вещества, синтезируемые микроорганизмами, как способ симбиотического взаимодействия с компонентами биоценозов 54

1.2 Трансформация органических субстратов как способ снижения антропогенной нагрузки на почвенные экосистемы 64

1.2.1 Переработка лигноцеллюлозных субстратов физико-химическими методами 64

1.2.2 Методы очистки почвы от проливов нефти 66

1.3 Применение биологических методов трансформации субстратов 67

1.3.1 Биологическая переработка лигноцеллюлозных отходов 67

1.3.2 Биоремедиация загрязненных нефтью почв 74

2 Объекты и методы исследования 78

2.1 Компостирование лигноцеллюлозных отходов 78

2.2 Скрининг микроорганизмов-нефтедеструкторов 85

2.3 Синтез микроорганизмами биологически активных веществ 92

3 Скрининг культур микроорганизмов, способных восстанавливать экологическое равновесие при антропогенном загрязнении 96

3.1 Скрининг культур для трансформации опилок 96

3.2 Скрининг пионерных микроорганизмов, колонизирующих свежий гидролизный лигнин 101

3.3 Скрининг микроорганизмов для биодеградации нефти 111

4 Симбиотическое взаимодействие микробных культур с почвенной биотой 132
4.1 Фитозащитный эффект микроорганизмов-нефтедеструкторов 132
4.2 Синтез микроорганизмами биосурфактантов 142
4.3 Синтез микроорганизмами биологически активных веществ 148
4.4 Влияние культуральных фильтратов дереворазрушающих грибов на растения и почву 153
4.5 Антагонистическое действие микроорганизмов 162
5. Микробная трансформация субстратов как способ восстановления почвенных экосистем 167
5.1 Изменение физико-химических параметров субстратов при микробном воздействии 167
5.2 Изменение агрохимических показателей лигноцеллюлозных субстратов в процессе переработки 175
5.3 Изменение биологических параметров субстратов и почвы при микробном воздействии 177
5.3.1 Изменение количества микроорганизмов в трансформируемом субстрате 177
5.3.2 Ферментативная активность трансформируемых субстратов и почвы при микробном воздействии 181
5.3.3 Фитотоксичность трансформируемых субстратов 187
6 Восстановление техногенно-нарушенных земель с помощью микробных ассоциаций или продуктов на их основе 195
6.1 Санитарно-гигиенические показатели лигноцеллюлозных компостов 195
6.2 Продуктивность агроценозов при использовании лигноцеллюлозных компостов 196
6.3 Микробная очистка почв от нефти 205
7 Депонирование штаммов 208
Заключение 209
Выводы 213
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 216
Приложение 1 Акты промышленных испытаний 271
Приложение 2 Протоколы исследований 272
Приложение 3 Свидетельства о депонировании культур микроорганизмов 276

ВВЕДЕНИЕ

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». Самопроизвольное, хотя и медленное, разложение загрязнителей сопровождается выделением в почву токсичных веществ, которая за счет своей огромной адсорбирующей поверхности способна аккумулировать загрязнения в значительных количествах, что приводит к изменению ее агрохимических, физических, микробиологических характеристик, утрате сельскохозяйственного значения. К наиболее опасным загрязнителям относятся нефть и нефтепродукты, древесные опилки, гидролизный лигнин (ГЛ). Объемы заготовки древесины в мире огромны (3.73 млрд $м^3$ в 2016 г. [1]) и ежегодно возрастают в среднем на 0.8 %. В связи с многолетней деятельностью крупных деревообрабатывающих предприятий загрязнение окружающей среды приобрело характер биосферного процесса. Российские предприятия производят ежегодно 3.5-6.0 млн $м^3$ опилок [2], а на полигонах гидролизных заводов только Иркутской области находится свыше 2 млн т гидролизного лигнина [3]. В России рационально используется не более половины биомассы заготавливаемой древесины. Мировая добыча нефти в 2015 году составляла около 4.4 млрд т в год, или 32.7 млрд баррелей в год, а в России - около 560.2 млн т в год [4]. Неизбежные при таких объемах потери составляют в России почти 5 % от общей добычи нефти [5]. Если вопросы

утилизации опилок и ликвидации проливов нефти в водоемы регулируются федеральными законами: утилизация опилок и стружки - № 89-ФЗ [6] и № 7-ФЗ [7], а нефти - №287-ФЗ [8], то регулирование на законодательном уровне ликвидации проливов нефти в почву или отвалов гидролизного лигнина отсутствует.

Экологические последствия загрязнения носят трудно учитываемый характер, поскольку нарушают многие естественные процессы и взаимосвязи, что приводит к глубокому изменению всех звеньев естественных биоценозов.

Воздействие исследуемых субстратов связано с изменениями как физико-химических (pH, аэрация, водопроницаемость и влагоемкость, соотношение C/N), так и биологических свойств почвы. Загрязнение препятствует нормальному тепло- и газообмену 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 [9]. 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 [10]. 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 демутации 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, как правило, толерантны к загрязнителю, обладают широким спектром ферментов, способствующих деструкции загрязнителя, а также способны синтезировать биологически активные вещества, 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 при восстановлении экологического равновесия техногенно-нарушенных почвенных экосистем, для улучшения физико-химических свойств и продуктивности агроландшафта.

Научная новизна работы.

Впервые в условиях Восточной Сибири из почв, эндо- и ризосферы растений, подвергшихся хроническому нефтяному загрязнению, выделены микроорганизмы, способные к эффективной деструкции углеводородов 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 микробоценоза, 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.

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 в 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 органо-минеральное удобрение защищен 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, отвалов 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 экобиотехнология 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 демутации, 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, статистический анализ и интерпретация полученных результатов проведены современными методами обработки информации.

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), Всероссийской 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 индексируемые в базе WoS/Scopus – 13), 1 обзор, 37 статей в материалах конференций и 2 патента на изобретение РФ.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Результаты исследований диссертационной работы соответствуют пп. 2, 3, 4, 7 паспорта специальности 03.02.08 Экология (биологические науки).

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 279 страницах и состоит из введения; обзора литературы; 5 глав, включающих описание объектов и методов исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение; выводов. Список литературы включает 484 источника, из них 196 иностранных. Работа иллюстрирована 44 таблицами и 48 рисунками.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и признательность научному консультанту д.б.н. Ю. А. Марковой за всестороннюю помощь, ценные обсуждения и практические советы при выполнении диисертационной работы; благодарность автор выражает д.б.н. Л. Е. Макаровой, сотрудникам лаборатории растительно-микробных взаимодействий СИФИБР СО РАН, оказавшим помощь при выполнении исследований. Особую благодарность автор выражает первым научным руководителям – д.х.н. С. А. Медведевой и к.б.н. И. В. Волчатовой и

коллегам – сотрудникам ИрИХ СО РАН. Большая благодарность родителям, детям и друзьям за то, что они всегда верили, что эта работа будет выполнена.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Экологические функции почв и их изменения при антропогенном загрязнении

Почва - сложнейшая экологическая система, сформировавшаяся на основе глобальной эволюции Земли [11-14]. Она взаимодействует с окружающей средой и оказывает, в свою очередь, влияние на все геосферы. В настоящее время установлено, что устойчивость экологических функций почв, обеспечивающих круговорот элементов в экосистемах, является основным условием устойчивости биосферы в целом, а следовательно, и устойчивости обеспечения жизни на Земле [15]. Эти функции можно разделить на три группы: глобальные, общебиосферные и биогеоценотические. Г. В. Добровольский [13] определяет их таким образом:

1. Почва – это уникальная среда обитания и физическая опора наземных организмов, обеспечивающая почвенную биоту водой, воздухом, минеральными и органическими элементами питания, защиту от экстремальных гидротермических и других колебаний внешней среды.
2. Почва выполняет в экосистемах функцию связующего звена в биологическом круговороте веществ и энергии, регулируя все потоки вещества в биосфере.
3. Биологическая продуктивность, т. е. плодородие почв, является основным источником питания не только человечества, но и всего наземного мира живых существ. Это определяется тем, что именно в почве концентрируются необходимые организмам биогенные элементы в доступных им формах химических соединений. Кроме того, почва обладает способностью аккумулировать необходимый для жизнедеятельности продуцентов биогеоценозов запасы воды, также в доступной им форме, равномерно обеспечивая их водой в течение всего периода вегетации. Наконец, почва служит оптимальной средой для укоренения наземных растений, обитания

многочисленных беспозвоночных и позвоночных животных, разнообразных микроорганизмов.

Еще одна классификация экологических функций почвы основана на их принципах действия [15]:

1. Химические – трансформация природных соединений (в том числе минералов), каталитическая активность.

2. Биохимические – деструкция органических веществ, накопление в почвенных горизонтах гумуса и связанной с ним химической энергии.

3. Биологические – генерирование и сохранение биологического разнообразия. Почва, являясь средой обитания для большого числа живых существ, ограничивает жизнедеятельность одних и стимулирует активность других. По отношению к человеку почва имеет еще одну специфическую функцию, являясь главным средством сельскохозяйственного производства и местом поселения людей.

4. Физико-химические – сорбция, десорбция и диффузия веществ; окислительно-восстановительные процессы; буферность почв. Эти процессы защищают литосферу от воздействия экзогенных факторов, регулируя процессы денудации суши.

5. Физические – почва является механической опорой, регулирует водный и тепловой режимы экосистем. Почва постоянно поставляет в атмосферу различные газы, в том числе и "парниковые" - CO_2, CH_4, а также множество так называемых "микрогазов". Одновременно почва поглощает кислород из атмосферы. Таким образом, в системе "почва - атмосфера" именно почва является генератором одних газов и "стоком" для других. В сухопутной ветви глобального круговорота воды почва избирательно отдает в поверхностный и подземный сток растворимые в воде химические вещества, определяя тем самым гидрохимическую обстановку в водах и прибрежной части океана. В результате в почве сохраняются влага и уровень температуры, обеспечивающие функционирование растений, микроорганизмов и почвенных животных.

Почвенная экосистема обладает высокой устойчивостью, но деятельность человека зачастую превышает ее адаптационные способности. Антропогенная нагрузка для различных почв существенно различается и прямо зависит от степени их освоения. Так, естественные экосистемы должны составлять: в тундре и лесотундре 98-100 % территории, в тайге: 80-90 % на севере и 45-50 % - на юге, в зоне смешанных лесов – 30- 35 %, в лесостепи 35-40 %, в степи 40-60 % [16]. Антропогенно обусловленная деградация окружающей среды давно перешагнула допустимые границы, в результате чего биосфера вошла в область экологически запрещённого взаимодействия человека и природы [17].

Загрязнение почв бывает:

Физическим, к которому относится изменение структуры поверхности земли, заключающейся в неправильной вспашке и обработке земель, неверно проведенной геопластике ландшафта, нарушении дренажа территории и лишении значительных площадей растительного покрова.

Химическим, заключающимся в неправильном внесении удобрений и общей химизации сельского хозяйства. От избыточной подкормки и применения гербицидов почвы теряют способность к поддержанию естественного плодородия и к смене естественных микробных сообществ на обширных территориях. Следы химикатов с урожаем по пищевой цепи заносятся в организм человека, вызывая химическое отравление. К химическому загрязнению относится также слив на почвы технических жидкостей и загрязнение тяжелыми металлами. Во всех подобных случаях возникает одна и та же экологическая проблема: на пораженных участках почв происходит полное вымирание почвенного биоценоза, прекращаются газообмен почвы с атмосферой и другие последствия. Поступающие в почву тяжелые металлы вступают в соединение с другими веществами, образуют намного более активные и ядовитые соединения и мигрируют по почвенному профилю и вниз по рельефу местности, включая в загрязненную территорию все большие площади.

Биологическим, к которму можно отнести микробиологическое, гельминтозное и энтомологическое. Многие патогены могут сохраняться в почве очень длительное время. Например, споры сибирской язвы способны сохранять жизнеспособность до 150 лет.

Любое загрязнение приводит к ухудшению экологических свойств почвы. Прежде всего изменяются *физические* свойства почвы - гранулометрический состав, происходит увеличение количества водопрочных агрегатов, структурных отдельностей размером больше 10 мм, а также агрегирование почвенных частиц, что приводит к росту глыбистых частиц [18]. Происходит вытеснение воздуха, нарушение поступления воды, питательных веществ, почвы теряют способность впитывать и удерживать влагу, а это ведет к неизбежному замедлению темпов развития растений и их элиминации. Кроме того, изменяются и *химические* свойства почв. Происходит изменение группового состава гумуса, перераспределение исходных запасов почвенного органического углерода в нижележащих горизонтах. В загрязненных почвах также изменяются и *агрохимические* свойства – снижается содержание таких важных элементов питания как обменный калий, подвижный фосфор, изменяется соотношение форм азота - повышается доля негидролизуемой фракции и снижается относительное содержание фракций гидролизуемого азота [19]. Существенном образом изменяется *почвенная микробиота*, причем разные группы микроорганизмов реагируют неодинаково. Загрязнение может как стимулировать рост определенных видов, так и подавлять развитие других. Снижение активности ферментов в загрязненной почве связано, в основном, с прямым ингибированием их каталитической активности [20]. Так, загрязнение желтоземов Черноморского побережья Кавказа Cr, Cu, Ni, Pb, нефтью привело к ухудшению их биологических свойств: снизились общая численность бактерий, активность каталазы и дегидрогеназы, целлюлозолитическая способность, обилие бактерий рода *Azotobacter*, усилились фитотоксические свойства почвы [21]. А загрязнение

антибиотиками снизило интегральный показатель биологического состояния почвы на 10-25% от контроля, причем наиболее чувствительными оказались численность аммонифицирующих бактерий и активность дегидрогеназ [22]. С течением времени микробиологическая активность почв, как правило, восстанавливается [18].

Независимо от источника загрязнения, почвенные экосистемы обладают способностью к адаптации, характеризующейся тем, что биологически позитивные изменения развиваются параллельно на разных уровнях организации экосистем, причем эти процессы часто протекают относительно независимо [23]. Восстановительные процессы на разных уровнях формируются в различных временных масштабах: от быстрых процессов (время развития - несколько дней) до процессов с характерным временем в несколько десятилетий. На фоне олиготрофности экосистем слабое и умеренное загрязнение антропогенными поллютантами вызывает активизацию процессов накопления (ростовые процессы) и деструкции биомассы (активизация грибов-деструкторов и почвенных ферментов-целлюлаз). Такой уровень загрязнения характерен для большого числа антропогенных нарушений. Микрофлуктуационное перемещение поллютантов (десятки и сотни метров) приводит к выравниванию их концентрации и разбавлению до биологически безопасного уровня в течение 1-3 месяцев (теплый сезон).

Один из важнейших механизмов устранения загрязнения почвенных экосистем и восстановления экологических функций почвы - принципиальная активизация природовосстановительных мероприятий. Среди них к первоочередным относится сохранение и восстановление природных почв и экосистем, являющихся центральным звеном стабилизирующего экофонда биосферы. Для России, с её крупнейшей в мире территорией, разработка и реализация природовосстановительных программ для всех географических зон, особенно лесостепных и степных, имеет

принципиальное значение. Их осуществление будет способствовать не только оздоровлению окружающей среды, но и всего общества.

1.1 Характеристика субстратов, являющихся опасными загрязнителями почвенных экосистем и используемых для биотрансформации

1.1.1 Древесина

Древесина - ценный продукт, использующийся в различных отраслях промышленности и составляющий важную часть экспортной продукции. Она представляет собой комплекс высокомолекулярных полимеров: полисахаридов (целлюлозы и гемицеллюлоз) и лигнина. Кроме этого, древесина содержит сравнительно небольшое количество экстрактивных и минеральных веществ, смол, восков, жиров, таннинов, пигментов и азотсодержащих соединений. В полостях клеток содержатся дубильные и красящие вещества, смолы, камеди, эфирные масла и алкалоиды [24]. Количество золы в древесине колеблется в пределах 0.2-1.7 % и зависит от породы дерева.

Содержание целлюлозы в древесине различных пород варьирует в пределах 34.2 - 61.6 %, в среднем на ее долю приходится 30 - 50 % абсолютно сухой массы. Это линейный полимер, состоящий из остатков *D*-глюкозы, соединенных β-1,4-гликозидными связями. Средняя степень полимеризации природной древесной целлюлозы в хвойных и лиственных породах равна 4000–5500 [25]. В древесине целлюлоза формируется в длинные фибриллы, связанные между собой водородными связями и силами Ван-дер-Ваальса. Целлюлозные фибриллы инкрустируются гемицеллюлозами и лигнином и объединяются в микрофибриллы, располагающиеся в клеточной стенке в разных направлениях [26]. Их размеры не зависят от слоя клеточной стенки, в котором они локализованы, и практически одинаковы для древесных и травянистых однолетних растений [27].

Гемицеллюлозы - полисахариды, отличающихся от целлюлозы гидролизуемостью в кислотах и растворимостью в щелочах. Их содержание в сухой древесине 21 - 41 % [28]. В состав гемицеллюлоз входят остатки *D*-ксилозы, *D*-маннозы, *D*-галактозы, *D*-глюкозы, *L*-арабинозы, *D*-галактуроновой и *D*-глюкуроновой кислот, соединенных β-1,4-; β-1,6- или β-1,3-гликозидными связями [29]. Молекулярная масса их структурных звеньев 340 г/моль. Средняя степень полимеризации гемицеллюлоз в хвойных породах древесины равна 100, а в лиственных - 150–200 [30]. В древесине гемицеллюлозы не формируют отдельных волокон, а покрывают волокна целлюлозы.

Лигнин образуется в результате полимеризации производных оксикоричных спиртов – *транс*-конифериловoго, *транс*-синапового и *транс*-*п*-кумарового. Лигнины различных видов растений различаются между собой соотношением исходных мономерных блоков и степенью метоксилирования ароматических ядер производных фенилпропановых структур, а это сказывается на химических и физических свойствах лигнинов различного происхождения [31]. Лигнин в растениях представляет собой инертный конечный продукт, который уже не вовлекается в метаболизм и выполняет лишь механические функции. Его присутствие в клеточной стенке растения обеспечивает ее структурную прочность, снижает проницаемость для воды и увеличивает устойчивость к микробным атакам. В состав древесины входит 18 % - 40 % лигнина [32]. В 2010–2018 гг. благодаря химическим и физико-химическим исследованиям и анализу большого информационного массива построена модель макромолекулы лигнина [33]. Молекулярная масса ее структурных звеньев 601 г/моль. Средняя степень полимеризации в ней принята 94 (как для хвойных, так и для лиственных пород древесины).

Одним из наиболее распространенных древесных отходов в сибирском регионе является гидролизный лигнин (ГЛ), который представляет собой твердый остаток после гидролиза растительного или сельскохозяйственного сырья растворами минеральных кислот. В результате гидролиза происходит

расщепление лигноуглеводных связей и конденсация макромолекул лигнина. В состав ГЛ входит значительно измененный лигнин, не отмытые после гидролиза углеводы, зольные элементы, минеральные и органические кислоты [34].

1.1.2 Нефть и нефтепродуктов

Сырая нефть - природная маслянистая горючая жидкость со своеобразным запахом, обладающая различной консистенцией от легко текучей до густой, малоподвижной. Цвет нефти может варьировать от бурого и темно-коричневого до черного, встречается также желтая, зеленоватая и бесцветная, так называемая «белая нефть» [35]. Нефть относится к группе горных осадочных пород вместе с песками, глинами, известняками, каменной солью и др. Она характеризуется способностью гореть и выделять тепловую энергию, обладая наивысшей теплотворной способностью. В химическом отношении нефть – сложная смесь углеводородов (УВ) и углеродистых соединений. Нефть включает примерно 250 сернистых, 85 кислородсодержащих и 30 азотсодержащих гетероциклических соединений и имеет следующий элементный состав, %: C 84-87 %, H 12-14 %, O до 0.35 %, N до 1.8 %, S 1-8 % [36, 37]. Углеводороды нефти делятся на три основные группы: алканы, циклоалканы и арены.

Алканы (метановые, парафиновые углеводороды (УВ) – предельные УВ общей формулs C_nH_{2n+2}, углеродный скелет которых представляет собой линейные или разветвленные цепи углеродных атомов, соединенных простыми связями. Наибольшим содержанием алканов (60-80 %) характеризуются легкие нефти из мезозойских и палеозойских отложений, залегающие на глубинах более 2000 м. В силу того, что они обладают малой химической активностью, их еще называют парафиновыми углеводородами. В зависимости от молекулярной массы и химической структуры парафиновые углеводороды существуют в газообразном, жидком и твердом агрегатном состоянии. Так, первые четыре члена гомологического ряда

(метан CH_4, этан C_2H_6, пропан C_3H_8, бутан C_4H_{10}) при нормальных условиях – газы, углеводороды от пентана C_5H_{12} до пентадекана $C_{15}H_{32}$ при тех же условиях – жидкости, а от гексадекана $C_{16}H_{34}$ и выше – твердые вещества [35].

Циклоалканы (нафтеновые углеводороды) имеют замкнутую углеводородную цепь и, как и парафиновые УВ, являются насыщенными. По плотности, температуре кипения и показателю преломления циклоалканы занимают промежуточное положение между алканами и аренами с тем же числом углеродных атомов в молекуле. Их содержание в нефтях и битумоидах колеблется в пределах 25-75 % [38].

Арены (ароматические УВ) - класс углеводородов общей формулы $C_пH_{2п-р}$, в состав молекул которых входит бензольное кольцо [39]. Арены наряду с алканами и циклоалканами составляют основную массу УВ ископаемого органического вещества. В нефтях моноциклические арены представлены бензолом и его гомологами. Арены имеют значительно более высокую плотность, показатель преломления, температуры кипения и кристаллизации, чем алканы и циклоалканы с тем же числом углеродных атомов в молекуле. Как правило, содержание аренов в нефтях 15-35 %. Известны, однако, нефти, содержащие более 35 % аренов (Чусовское месторождение в Волго-Уральской области). Основная масса аренов нефтей представлена УВ гомологического ряда бензола - в среднем 67 % от общего количества аренов [38].

Смолы и асфальтены. Асфальтенами называют соединения нефти, не растворимые в низших *н*-алканах (*н*-пентане, *н*-гексане, *н*-гептане), но растворимые в ароматических УВ (толуоле).

Асфальто-смолистая часть нефти представляет собой вещество темного цвета, которое частично растворяется в бензине. Растворившаяся часть – асфальтены - это наиболее высокомолекулярная фракция, отличающаяся от смол меньшим содержанием в молекулах водорода и значительно большим количеством ароматических циклов. Они обладают способностью набухать в

растворителях, а затем переходить в раствор. Растворимость асфальтенов в смолисто-углеродных системах возрастает с уменьшением концентрации легких УВ и увеличением концентрации ароматических углеводородов. Смолы являются полярными веществами с относительной молекулярной массой 500-1200. В них содержится основное количество кислородных, сернистых и азотистых соединений нефти. Асфальто-смолистые вещества и другие полярные компоненты являются поверхностно-активными соединениями нефти и природными стабилизаторами водонефтяных эмульсий. В сырых нефтях содержание асфальтенов и смол может достигать 15 % [40]. На основании многочисленных исследований химического строения молекул асфальтенов считают, что они представляют собой полициклическую ароматическую конденсированную систему с короткими алифатическим заместителями у ароматических ядер. В состав молекулы асфальтена входят фрагменты гетероциклических, алициклических, конденсированных углеводородов, состоящие из 5—8 циклов. [41]. Все металлы, находящиеся в нефтях, концентрируются в смолах и асфальтенах [42].

1.4 Скрининг микроорганизмов по способности трансформировать органические субстраты

Применению высокоактивных микроорганизмов обычно предшествует большая исследовательская работа. Первоначальное выделение микроорганизмов проводят из того материала, который предполагается компостировать. Это может быть зараженная грибами древесина, гидролизный лигнин, солома различных сельскохозяйственных растений, нефть и нефтепродукты, машинное масло, гексадекан и почва. Основным критерием служит способность микроорганизма воздействовать на соответствующий субстрат. Например, из почвы, загрязненной нефтью, было

выделено 9 штаммов микроорганизмов - потенциальных биодеструкторов органических отходов и ксенобиотиков [43].

Первичный скрининг, как правило, проводится на селективной питательной среде, единственным источником углерода в которой является исследуемый субстрат. Некоторые исследователи добавляют в начальной фазе роста микроорганизма небольшое количество глюкозы, стимулирующей развитие [44]. Выбор питательной среды зависит от вида предполагаемого микроорганизма, но проводится согласно общим требованиям скрининга. Так, среда не должна содержать сложных органических соединений переменного состава (пептон, дрожжевой экстракт) [45]. В некоторых случаях используется метод накопительных культур на полных питательных средах, с последующим пересевом на бедные, селективные среды с выделением единичных колоний микроорганизмов методом истощающего штриха [46]. По результатам первичного скрининга обычно отбирается достаточно большое количество микроорганизмов. В работе [47] из компостированной коры эвкалипта было отобрано 44 гриба и 8 актиномицетов, а М. Г. Велиев с соавторами [48] из воды и грунта Каспия, содержащих нефтепродукты, выделили 40 различных культур. Существует несколько путей дальнейшего скрининга, направленного на отбор высокоактивных штаммов. Наиболее простым и общеупотребимым является контроль убыли субстрата в процессе роста микроорганизма и скорость накопления биомассы [49]. Кроме того, определяют способность культуры к росту на жидких и твердых питательных средах с субстратом или соединениями, его моделирующими [50, 51].

Возможен также отбор перспективных культур по их ферментативной активности. Прежде всего, необходимо учитывать наличие ферментов оксидазного типа в случае разложения лигнина и нефти и целлюлазных – для деструкции целлюлозосодержащих материалов [52-54].

В некоторых случаях используют дополнительный “бонусный” скрининг. Его особенность заключается в отборе среди микроорганизмов,

уже рекомендованных для деструкции отходов, штаммов, обладающих побочными положительными качествами. Как правило, это антимикробная или противопаразитарная активность. Например, И. И. Новиковой с соавторами [55] была проведена направленная селекция *Trichoderma asperellum* для ускоренной утилизации полимеров растительных остатков и снижения количества почвенных фитопатогенов.

Еще одним параметром «бонусного» скрининга является температура. В связи с тем, что большинство месторождений нефти расположено в северных регионах, встает вопрос о целенаправленном внесении селекционированных штаммов-деструкторов. В настоящее время имеются работы, посвященные поиску микроорганизмов - деструкторов углеводородов, устойчивых к низким температурам. И. А. Пырченковой с соавторами [56] изучена способность микроорганизмов - нефтедеструкторов к росту на дизельном топливе и нефти при 4-6 ^{0}C и 24 ºC, а также при повышенной концентрации NaCl (до 6 %). Показано, что у *Rhodococcus* sp. (штаммы Q15, S26, X5) и у *Pseudomonas* sp. (штамм 142 NF) степень деструкции выше при низких температурах.

Авторы [57] из техногенно-загрязненной почвы Красноярского края выделили и идентифицировали 8 бактериальных штаммов, способных к разложению различных углеводородов: декана, толуола и β-метилнафталина в условиях низких положительных температур. В работе [58] показано, что *Rhodococcus erythropolis* (штамм BZ4) способен к деградации углеводородов при 15 ^{0}C, *Rhodococcus cercidiphyllus* (штамм BZ22), *Arthrobacter sulfureus* (штамм BZ73) и *Pimelobacter simplex* (штамм BZ91) разлагали *н*-алканы (C_{12}-C_{22}), ароматические углеводороды (фенол) и полиароматические углеводороды (антрацен, пирен) при 1-30 °C.

В то же время при поиске микроорганизмов-деструкторов необходимо учитывать, что вносимая в почву микробная биомасса не должна быть чужеродной для почвенной микрофлоры. Еще одним важным условием является их непатогенность. Микроорганизмы-деструкторы должны обладать

высокой жизнестойкостью, так как они могут подвергаться воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, таким как колебания температуры, высокая и низкая влажность, изменение pH среды, нехватка питательных элементов [59, 60-64].

Одним из путей скрининга является исследование способности микроорганизмов деструктировать соединения с известной химической структурой, моделирующие отдельные фрагменты и связи в лигнине или структурные компоненты нефти. Достоинством этого метода является относительная простота и прогнозируемость образующихся продуктов, легкость проведения эксперимента. К недостаткам моделирования можно отнести то, что обычно модели - низкомолекулярные, преимущественно водорастворимые соединения, тогда как исходный субстрат – высокомолекулярное, нерастворимое в воде вещество. И, тем не менее, использование моделей может считаться достоверным экспериментальным подходом к скринингу как лигнинразрушающих, так и нефтеокисляющих микроорганизмов. Способностью разлагать модельные соединения обладает целый спектр микроорганизмов, относящихся к разным таксономическим группам. Так, *Azospirillum lipoferum* окислял вератровый спирт до вератровой кислоты [65], *Streptomyces* sp. конвертировал ванилиновую кислоту в гваякол [66], а *Bacillus subtilis* трансформировал изоэвгенол в ванилин [67]. В зависимости от требований скрининга используют вещества более сложного состава. Например, выделенные бактери *Citrobacter* sp. 36 4CPA, *Stenotrophomonas* sp. 33T и *Xanthomonas* sp. 33DCP способны активно метаболизировать фенол, 2,4-дихлорфенол, 4-хлорфеноксиуксусную, 2,4-дихлорфеноксиуксусную и 2,4,5-трихлорфеноксиуксусную кислоты [68], а *Penicillium tardum* был способен утилизировать *п*-крезол и гваяколовую смолу, являющиеся отходами пиролиза лигнина [69]. В работе [70] показана способность грибов *Trametes villosus* и *Phanerochaete chrysosporium* деструктировать широкий ряд модельных соединений лигнина, в том числе и димерные *β*-*O*-4-алкил-ариловые вератрилзамещенные эфиры.

1.5 Процессы, происходящие при трансформации органических субстратов

1.5.1 Компостирование лигноцеллюлозных отходов

Под компостированием понимают окислительное разложение отходов любого происхождения под действием биологических факторов в контролируемых условиях [71]. У этого процесса отмечены две важные черты – биологическое участие, что отличает компостирование от физической или химической переработки, и преимущественно аэробное превращение, в противоположность ферментации и анаэробной утилизации.

В ходе компостирования происходит деструкция легкоразлагаемых компонентов древесины, в том числе и фитотоксичных веществ, аэробное разложение ее макрокомпонентов и синтез гумуса из продуктов частичного распада. Процесс компостирования зависит от многих изменяющихся химических, физических и биологических параметров. Успешное компостирование - результат непрерывного взаимодействия многих факторов: развития микробного сообщества, влажности, аэрации и температуры [72].

Скорость компостирования в значительной мере зависит от различных физико-химических параметров. Важнейшим из них является аэрация. Аэрационные требования микроорганизмов зависят от типа отходов, температуры, стадии и условий процесса [73]. Аэробное компостирование в основном происходит во внешней зоне бурта, где протекает интенсивный процесс разложения органического вещества с выделением углекислого газа и промежуточных продуктов распада, в то время как внутренняя зона может подвергаться анаэробному разложению [74]. При анаэробной ферментации образуются метан, CO_2 и другие продукты неполного распада, типа органических кислот и спиртов [75], а также накапливаются токсические вещества, в том числе в жидкой и газообразной формах. Образуются газообразный оксид азота, легко вымываемые калий, магний и органический

фосфат. При внесении таких незрелых компостов анаэробные гнилостные бактерии оказывают вредное воздействие на почву и растения, подкисляют почву, а в переувлажненных условиях могут выделять метан. Обычно используют естественную, пассивную и принудительную вентиляцию [76].

На скорость разложения древесных отходов существенное влияние оказывает влажность. Оптимальная влажность - 55-75 % [77]. При высокой влажности протекает анаэробная ферментация, а ее снижение приводит к замедлению или прекращению процесса компостирования. Снижение влажности характеризуется также сменой видового состава микроорганизмов, населяющих компост. Так, при влажности менее 35 % происходит преимущественная колонизация компоста фитопатогенными грибами рода *Pythium* и вытеснение ими сапрофитной микрофлоры [77]. Минимальный уровень влажности, при котором еще возможно заселение компоста микроорганизмами, составляет 12-15 %, однако такая сухая смесь будет компостироваться в течение очень длительного времени [78].

На скорость компостирования и качество компоста влияет соотношение углерода и азота (C/N). Для компостов характерно постепенное снижение содержания углерода, связанное с минерализацией органического углерода, при относительно постоянном уровне азота. Оптимум C/N составляет 25-40 [79]. Компосты с соотношением C/N более 40 характеризуются медленным, неэффективным разложением, требующим большого количества времени для созревания [80]. Включение в экосистему компоста с таким C/N вызывает азотное голодание растений вследствие иммобилизации азота почвы в микробной биомассе [81-83].

Температура - доминирующий параметр, который контролирует микробную деятельность в течение компостирования и, в то же время, сам определяется активностью микроорганизмов [84]. У процесса компостирования принято выделять три стадии [85]:

1. Начальную, обычно длящуюся 4-10 дней и являющуюся периодом быстрого возрастания температуры до 40-45 °C [86]. Первая стадия

компостирования заканчивается исчерпанием мезофильным микробным сообществом легкодоступных субстратов [79].

2. Термофильная стадия, связанная с аэробной ферментацией, являющейся экзотермическим процессом. Температура компостирования в бурте может достигать 70-80 °С. Повышение температуры является показателем интенсивности ферментации и успешности процесса компостирования. Если в течение 10 дней внутренняя часть бурта не разогревается до 60 °С, то это свидетельствует об отсутствии ферментации. Причинами могут быть недостаточная влажность, плохая аэрация, высокая кислотность компостируемой смеси, низкая температура окружающего воздуха и отсутствие эффекта вследствие малого объема бурта.

В течение термофильной стадии деградирует большая часть целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина [86]. Однако при температуре выше 70 °С процесс биодеградации подавляется из-за ингибирования роста микроорганизмов. Лишь немногие виды термофильных бактерий сохраняют активность при такой высокой температуре, но зато гибнут термочувствительные патогенные бактерии и семена сорняков [87].

После достижения максимума температуры наблюдается ее снижение, что связано с истощением запасов доступных для микроорганизмов питательных веществ, недостатком влаги вследствие испарения во время разогрева, плохой аэрацией в результате естественного уплотнения компостируемого материала [74]. Снижение температуры служит сигналом о необходимости перемешивания компостного бурта. Вторичное повышение температуры связано, в первую очередь, с улучшением доступа кислорода в глубинные слои бурта. За время компостирования перемешивание проводят 4-5 раз. По мере созревания компоста интенсивность ферментации затухает. Термофильная стадия завершается, когда температура не повышается даже после перемешивания. Во время термофильной стадии происходят сложные реакции между остатками лигнина и белками погибших микроорганизмов, что приводит к образованию гумусовых веществ, причем возрастает

отношение гуминовых кислот к фульвокислотам, достигая к концу ферментации двух и более [88]. В то же время увеличивается степень ароматичности гуминовых кислот [89].

3. Третья стадия компостирования – стабилизация компоста. На этой стадии происходит восстановление численности мезофилов, практически элиминированных из компоста во время термофильной стадии, формируется сообщество микроорганизмов, представляющих все основные классы, характерное для зрелых компостов, продолжается стабилизация синтезированных гумусовых веществ [90]. Питательные элементы сохраняются в гумусе от вымывания и служат своеобразным резервуаром пролонгированных источников питания и биологически активных веществ для растений. По мере созревания компоста возрастает и его обменная емкость. Кроме того, к концу компостирования уменьшается доля частиц размером более 0.5 мм и возрастает количество более мелких фракций.

1.5.2 Микробная трансформация нефти

Углеводороды нефти окисляются микрорганизмами в следующей последовательности: алифатические > ароматические > смолы > асфальтены. Наиболее активно разрушаются *н*-алканы с длиной цепи C_{12}-C_{22}. Более устойчивы к окислению изо- и циклоалканы, а также ароматические углеводороды. Многие из них в виде моносубстратов не способны использоваться микроорганизмами, они разлагаются в режиме соокисления с другими более доступными углеводородами. Биодеградация смол и асфальтенов затруднена из-за их устойчивости к воздействию ферментов и малой способности диспергироваться в жидкой фазе, поэтому время полураспада этих соединений варьирует от 4 до 2000 недель [91].

Деструкция *н*-алканов. Окисление углеводородных субстратов происходит внутри бактериальных клеток, что определяет необходимость специфического способа их переноса в клетку. Например, транспорт углеводородов у *Rhodococcus* идет в два этапа. На первом этапе происходит

пассивная диффузия *н*-алканов через всю поверхность клеточной стенки до цитоплазматической мембраны, где они могут накапливаться и удерживаться без изменения структуры. Основную роль в поглощении жидких углеводородов на этом этапе играют образующие клеточную стенку липиды и миколовые кислоты, которые обусловливают непосредственный контакт углеводородного субстрата с клетками микроорганизма. На втором этапе происходит активный транспорт углеводорода через цитоплазматическую мембрану с последующим их растворением в ее липидах. Ферментные системы, ответственные за окисление углеводородов, локализованы в мембранных структурах клеток или цитоплазме.

Микробная деградация алканов возможна благодаря наличию в клетке структур, обеспечивающих поглощение гидрофобного субстрата. Ферменты микроорганизмов, осуществляющие деградацию алканов, относятся к классу оксидоредуктаз смешанных функций (оксигеназ) и связаны с мембранными структурами клеток. Оксигеназы катализируют включение одного атома кислорода из его молекулярной формы в концевую метильную группу углеводорода [92].

Химизм процессов окисления нормальных парафинов изучен достаточно подробно и хорошо описан в литературе [92-94].

Известны три пути окисления алифатических углеводородов:

1. монотерминальное окисление *н*-алкана с образованием первичного спирта, альдегида и монокарбоновой кислоты;
2. субтерминальное окисление с образованием вторичного спирта и метилкетона;
3. дитерминальное окисление с образованием жирных дикарбоновых кислот.

Актинобактерии рода *Rhodococcus* способны окислять алканы всеми путями, однако наиболее распространенным является монотерминальное окисление. При монотерминальном окислении концевая метильная группа посредством монооксигеназ окисляется до первичного спирта [93]. Ферментные системы, участвующие в оксигенировании субстрата, зависят от

длины углеводородной цепи: C_1-C_5 алканы окисляются растворимыми или мембрансвязанными метан-монооксигеназами; C_5-C_{16} алканы – алкан-гидроксилазными системами, содержащими негемовое железо или цитохром-P450-монооксигеназами; алканы, содержащие более 17 атомов углерода – диоксигеназами. Окисление гексадекана у представителей рода *Rhodococcus* происходит с участием трехкомпонентного алкан-гидроксилазного комплекса, состоящего из растворимых НАДН-рубредоксинредуктаз и рубредоксина, а также мембрансвязанной монооксигеназы или алкангидроксилазы. Следующий этап включает окисление образовавшегося из углеводорода первичного спирта до альдегида, а затем, под действием НАД-зависимых дегидрогеназ, до соответствующей жирной кислоты [94]:

$$R\text{-}CH_2\text{-}CH_3 + [O] \rightarrow R\text{-}CH_2\text{-}CH_2OH - 2H \rightarrow R\text{-}CH_2\text{-}CHO - 2H + HOH \rightarrow R\text{-}CH_2\text{-}COOH$$

Далее, посредством β-окисления, протекающего через последовательное отщепление двуглеродных фрагментов в виде активного ацетата, поступающего в цикл трикарбоновых кислот, осуществляется усвоение жирных кислот, образующихся при окислении УВ.

Кроме β-окисления, редукция жирных кислот, образовавшихся в результате окисления *н*-алканов , может происходить за счет ряда вторичных реакций:

а) ω–гидроксилирование, в результате которого образуются сначала ω-оксикарбоновые, а затем дикарбоновые кислоты с дальнейшей фрагментацией [93];

б) α-окисление, декарбоксилирование, характерное для соединений, в которых субтерминальный атом углерода связан с кетогруппой или гидроксилом;

в) дегидрогенизация жирной кислоты с последующим окислительным расщеплением двойной связи.

Существуют вспомогательные способы окисления субтерминальных или внутренних атомов углерода, в результате которых образуются вторичные спирты и кетоны.

У некоторых микобактерий метаболизм *н*-алканов осуществляется через метилкетоны. Промежуточными продуктами такого метаболизма являются перекиси и вторичный спирт. Дальнейшее окисление кетонов изучено недостаточно.

Бактерия *Brevivacterium* sp. способна окислять пропан через ацетон, после чего осуществляется атака терминальной метильной группы и последующее декарбоксилирование:

$$CH_3CH_2CH_3 \rightarrow CH_3CHOHCH_3 \rightarrow CH_3COCH_3 \rightarrow CH_3COCH_2OH \rightarrow CH_3COOH$$

Известен следующий механизм деградации тридекана микроорганизмами рода *Pseudomonas aeruginosa*:

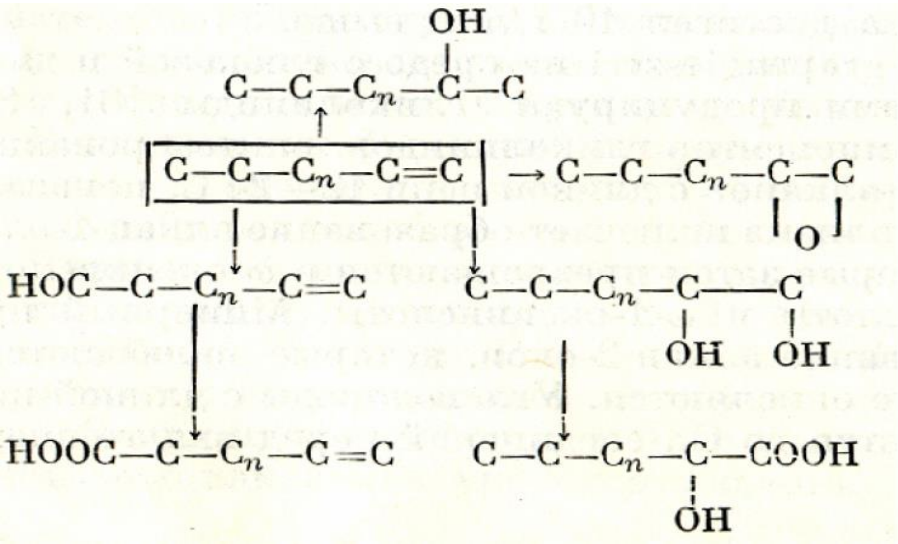
$$CH_3(CH_2)_{11}CH_3 \rightarrow CH_3(CH_2)_{10}CHOHCH_3 \rightarrow CH_3(CH_2)_{10}COCH_3 \rightarrow CH_3(CH_2)_9CH_2OCOCH_3 \rightarrow$$
$$CH_3(CH_2)_9CH_2OH + CH_3COOH$$
$$\downarrow$$
$$CH_3(CH_2)_9COOH$$

Конечными продуктами метаболизма алканов в почве являются углекислота (связывается в составе карбонатов), вода и кислородсодержащие соединения (спирты, кислоты, альдегиды, кетоны), которые частично входят в почвенный гумус, частично растворяются в воде и удаляются из почвенного профиля.

Деструкция алкенов. Микроорганизмы способны осуществлять окисление алкенов посредством ряда химических реакций: 1. окисление метильной группы с последующим образованием ненасыщенных кислот; 2. образование эпоксидов по двойной связи, 3. образование диолов [95]. Окисление алкенов может происходить как по терминальной метильной группе, так и по двойной связи, причем нередко эти процессы происходят параллельно. Впервые в 60-х годах был исследован способ терминального окисления метильной группы алкенов-1 без участия двойной связи эфирообразующими бактериями *Micrococcus cerificans* [96]. Позднее был исследован способ окисления с образованием эпоксидов, диолов, α-оксикислот и ненасыщенных кислот [96-98].

Окисление одновременно по терминальной метильной группе и двойной связи было доказано A. J. Markovetz с сотрудниками на примере окисления

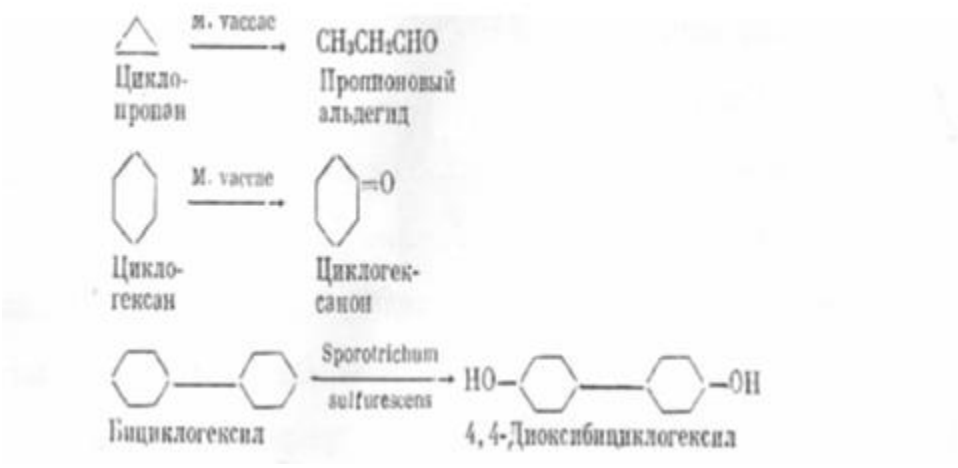
тетрадецена микроорганизмами *Pseudomonas aeruginosa* [97]. Был выделен и идентифицирован продукт реакции – тетрадеценовая-13 кислота и тетрадеканол-2, что подтверждает факт окисления как по концевой двойной связи, так и по метильной группе. Кроме этого, исследования, проведенные позже на культуре микроорганизмов *Micrococcus cerificans*, установили наличие механизма двойного окисления гексадецена-1 и октадецена-1. Микроорганизмы *Pseudomonas oleovorans* также способны эпоксидировать не только октен-1 (относящийся к классу алкенов), но и октадиен-1,7 (относящийся к классу алкадиенов) с образованием моноэпоксида:



Исследован способ терминального и субтерминального окисления олефинов дрожжами и грибами с образованием ω-ненасыщенных кислот, ω-ненасыщенных спиртов, эпоксидов, диолов, насыщенных кислот и т.д. [95].

Деструкция циклоалканов. Циклоалканы поддаются биологическому разложению труднее алканов, что связано с наличием цикла, который окисляется сложнее, чем молекулы с линейной структурой. Штаммы, способные деструктировать циклоалканы, имеют специфические ферментные системы, окисляющие циклогексан до циклогексанола, а его – до адипиновой, валериановой, муравьиной кислот. Белок, катализирующий первую реакцию, гомологичен бутан-монооксигеназе [99]. Отсутствие открытой концевой метильной группы как у *n*-алканов усложняет первичную атаку. Циклоалканы, включая конденсированные циклоалканы, деградируют по механизму со-окисления.

Схема деградации циклогексана [100]:



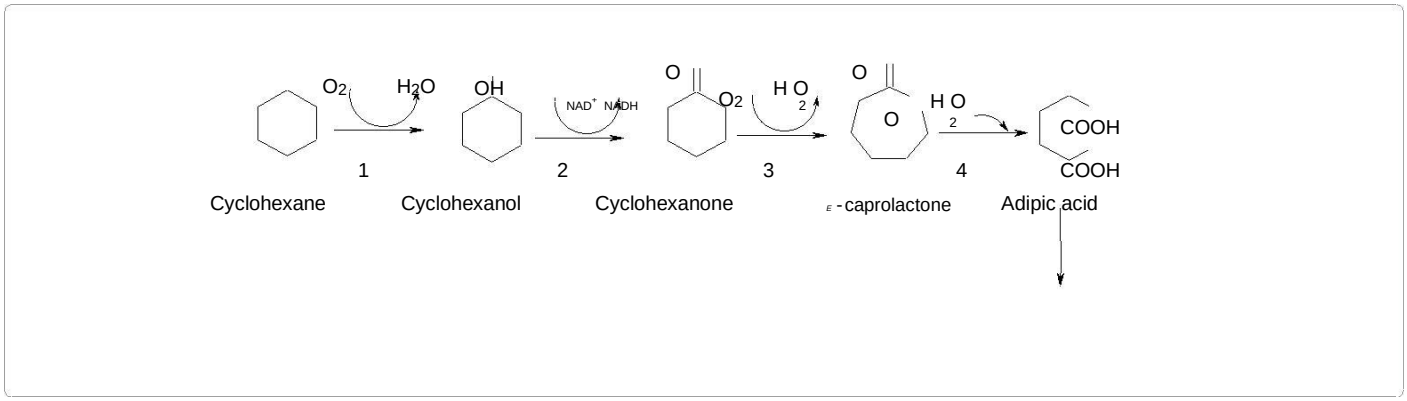


Схема: периферический метаболический путь аэробной деградации циклогексана. 1-циклогексанмонооксигеназа, 2–циклогексанол дегидрогеназа, 3-циклогексанон монооксигеназа, 4-капролактонгидролаза [100].

Деструкция ароматических углеводородов. Структура ароматических углеводородов является крайне устойчивой и трудно поддается микробному разрушению. Аэробные микроорганизмы окисляют ароматическое кольцо до таких дигидроксиароматических соединений как протокатеховая кислота, гентизиновая кислота, пирокатехин, после чего следуют реакции, связанные с раскрытием ароматического кольца. При этом раскрытие ароматического кольца для пирокатехина и протокатеховой кислоты, катализируемое диоксигеназами [101], может идти между двумя гидроксильными группами − интрадиольный путь (*орто*-расщепление) или рядом с одной из гидроксильных групп − экстрадиольный путь (*мета*-расщепление). В случае гентизиновой кислоты расщепление кольца происходит между

карбоксильной группой и смежной гидроксильной группой. Основная роль в деградации ароматических соединений принадлежит катехол-, протокатехат- и гентизатдегидрогеназам, которые катализируют реакции расщепления ароматического кольца. Конечными продуктами *орто*-расщепления пирокатехина являются янтарная и уксусная кислоты, которые далее включаются в цикл Кребса. В раскрытии ароматического кольца пирокатехина по *мета*-пути могут быть задействованы два механизма. Согласно первому, альдегид 2-гидроксимуконовой кислоты под действием НАД-зависимой дегидрогеназы может окисляться до соответствующей 2-гидроксимуконовой кислоты, которая под действием таутомеразы переходит в таутомерную форму. На следующих этапах происходит декарбоксилирование. В соответствии со вторым механизмом, гидролитическое расщепление альдегида 2-гидроксимуконовой кислоты может осуществляться с образованием муравьиной и 2-гидроксипентадиеновой кислоты, которая под действием гидратазы переходит в 4-гидрокси-2-оксопентановую кислоту, которую альдолазы расщепляют до ацетальдегида и пирувата. Длинные алифатические заместители ароматических соединений расщепляются по механизму β-окисления до более коротких боковых фрагментов, после чего образовавшиеся интермедиаты претерпевают расщепление ароматического кольца по одному из приведенных выше механизмов [101].

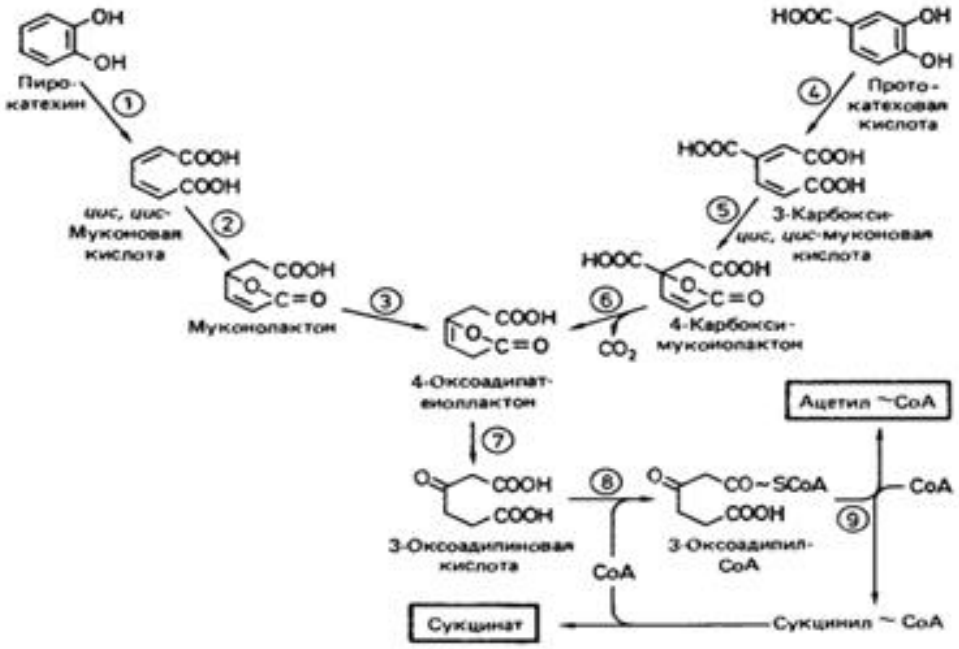


Рис. 14.10. *Орто*-расщепление ароматического кольца и путь 3-оксоадипиновой кислоты. Участвующие ферменты: *1* – пирокатехаза (катехол-1,2-диоксигеназа); *2* – муконатциклоизомераза; *3* – муконолактон-изомераза; *4* – протокатехат-3,4-диоксигеназа; *5* – 3-карбоксимуконат-циклоизомераза; *6* – 4-карбоксимуконолактон-декарбоксилаза; *7* – 4-оксоадипат-еноллактонгидролаза; *8* – 3-оксоадипат-сукциниил-CoA-трансфераза; *9* – 3-оксоадипил-CoA-тиолаза.

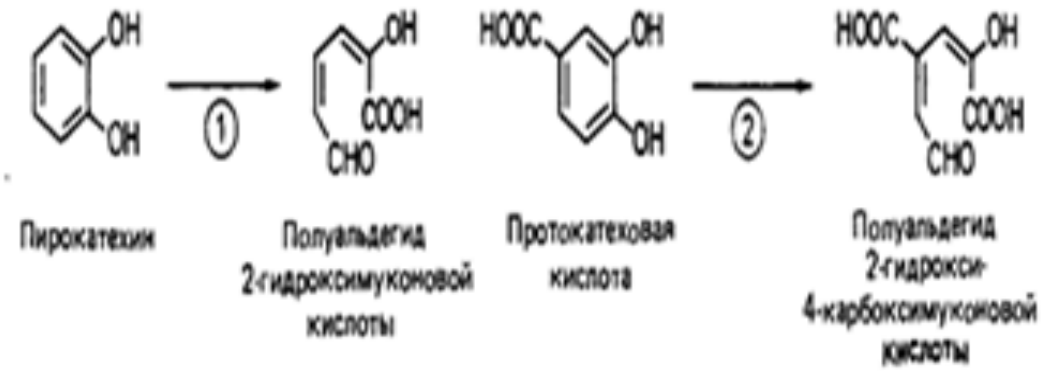


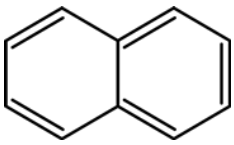
Рис. 14.11. *Мета*-расщепление ароматического кольца. Участвующие ферменты: *1* – метапирокатехаза (катехол-2,3-диоксигеназа); *2* – протокатехат-4,5-диоксигеназа.

Пируват + ацетальдегид **2 пируват**

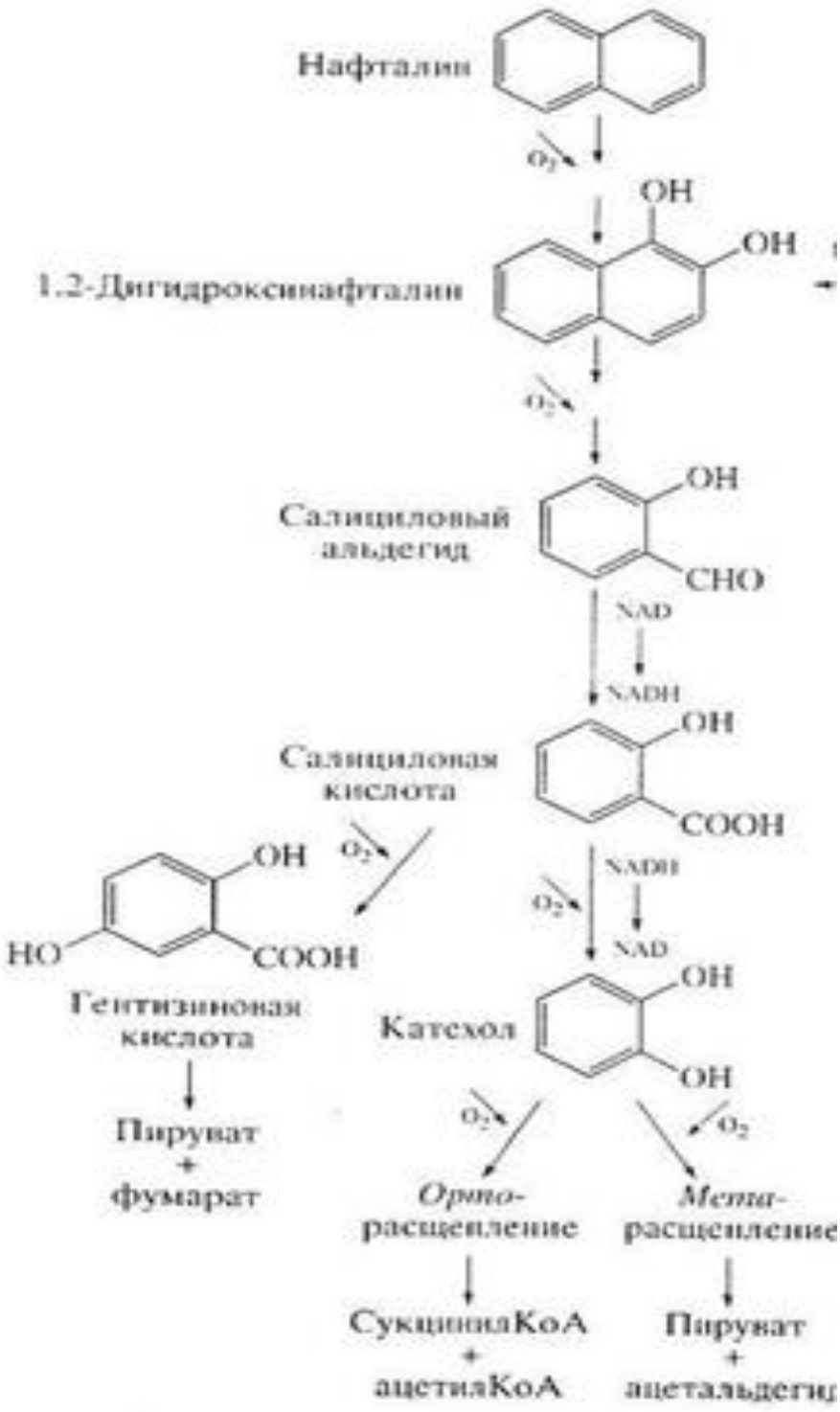
Деструкция полиароматических углеводородов. Полиароматические углеводороды (ПАУ) – наиболее трудноразлагаемые органические

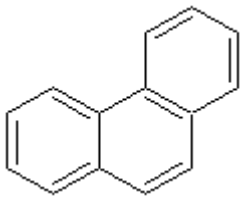
поллютанты, обладающие токсическими, канцерогенными и мутагенными свойствами. К самым устойчивым соединениям можно отнести бенз(а)пирен.

Бактерии и некоторые зеленые водоросли окисляют ПАУ, используя оба атома молекулярного кислорода (реакция катализируется диоксигеназой), при этом получается *цис*-гидродиол, который затем подвергается гидрогенизации, образуя пирокатехин. Скорость деградации ПАУ обратно пропорциональна числу колец в молекуле. Это связано с низкой растворимостью в воде, которая снижается с увеличением числа ароматических колец. Ферментативная атака колец ПАУ происходит только в аэробных условиях [102], но некоторые ферментативные системы, такие как метан-монооксидазы и лигнин-пероксидазы участвуют в анаэробном разложении ПАУ. Штаммы *Pseudomonas* и *Flavobacterium* способны окислять антрацен и фенантрен, образуя в качестве промежуточных продуктов салициловую кислоту и пирокатехин [103].

Самый простой с химической точки зрения ПАУ – нафталин,  состоящий из двух конденсированных бензольных колец. Первая реакция деградации нафталина, катализируемая нафталин-диоксигеназами и дегидрогеназами, приводит к образованию *цис*-1,2-дигидрокси-1,2-дигидронафталина, хотя в некоторых случаях под действием диоксигеназных систем может образовываться *цис*-2,3-дигидрокси-2,3-дигидронафталин. Последующее образование 1,2-дигидроксинафталина происходит с участием ферментов в присутствии НАДН, что отличает нафталин-диоксигеназы представителей родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas*. На следующем этапе происходит раскрытие ароматического кольца по *мета*-пути, которое завершается образованием салициловой кислоты. Метаболическое разложение последнего протекает с участие салицилат-5-гидроксилазы через гентизиновую кислоту или пирокатехин. При этом, в случае пирокатехина, конечным продуктами биоразложения являются

ацетил- и сукцинил кофермент-А, а в случае гентизиновой кислоты – ацетоацетат и фумарат [95]:



Окисление фенантрена  **.** Известны несколько микрорганизмов, утилизирующих фенатрен как единственный источник энергии: *Commomonas testosterone*, *Burkholderia* sp, *Alcaligenes faecalis*, *Springomonas* sp, *Micobacterium* sp., *Pseudomonas putida* [95], Описаны два различных пути деградации фенантрена. Сначала он в результате последовательных реакций трансформируется до 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты. Дальнейшие биохимические пути деградации этого соединения различны. 1-Гидрокси-2-нафтойная кислота метаболизируется либо через салициловую кислоту и пирокатехин, либо через образование *о*-фталата и протокатеховой кислоты. Пирокатехин и протокатеховая кислота далее расщепляются по *орто*- или *мета*-пути до интермедиатов цикла Кребса. Существует альтернативный путь окисления салициловой кислоты через гентизиновую кислоту.

Так, главный продукт окисления нафталина — салициловая кислота; антрацена — 3-гидрокси-2-нафтойная; фенантрена — 1-гидрокси-2 нафтойная; хризена — гидроксифенантренкарбоновая и бензо[а]пирена — гидроксипиренкарбоновая кислоты.

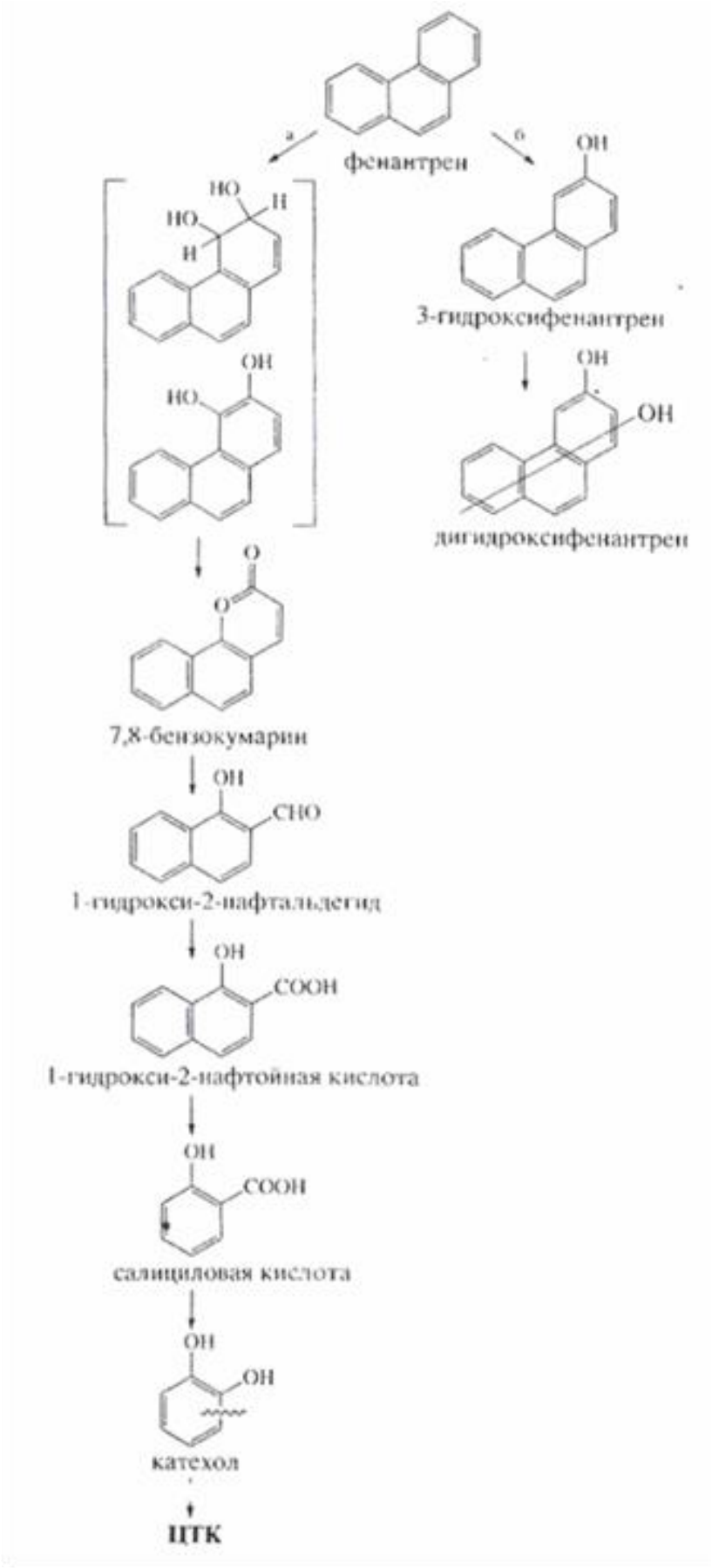


Схема превращения фенантрена *R.opacus* 412 и *R.rhodnii* 135 [104]:

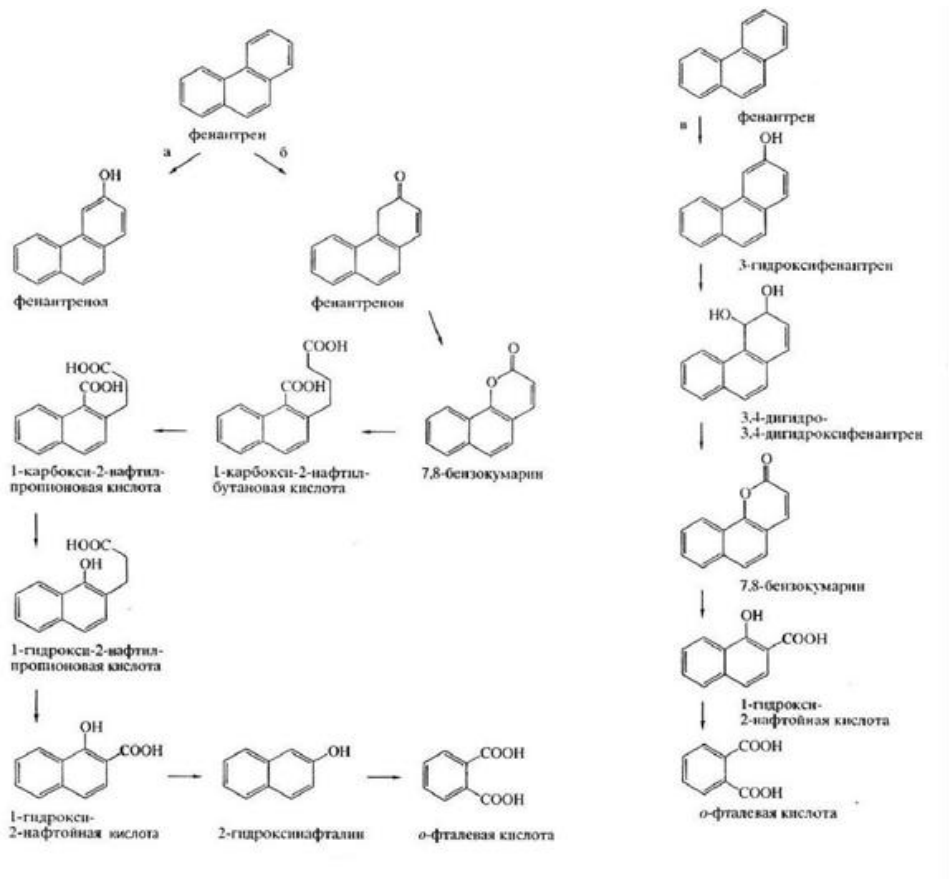
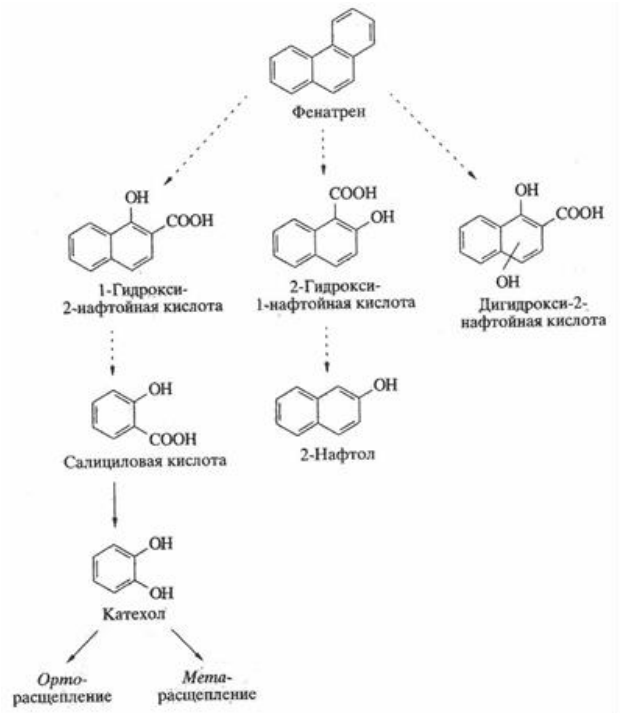


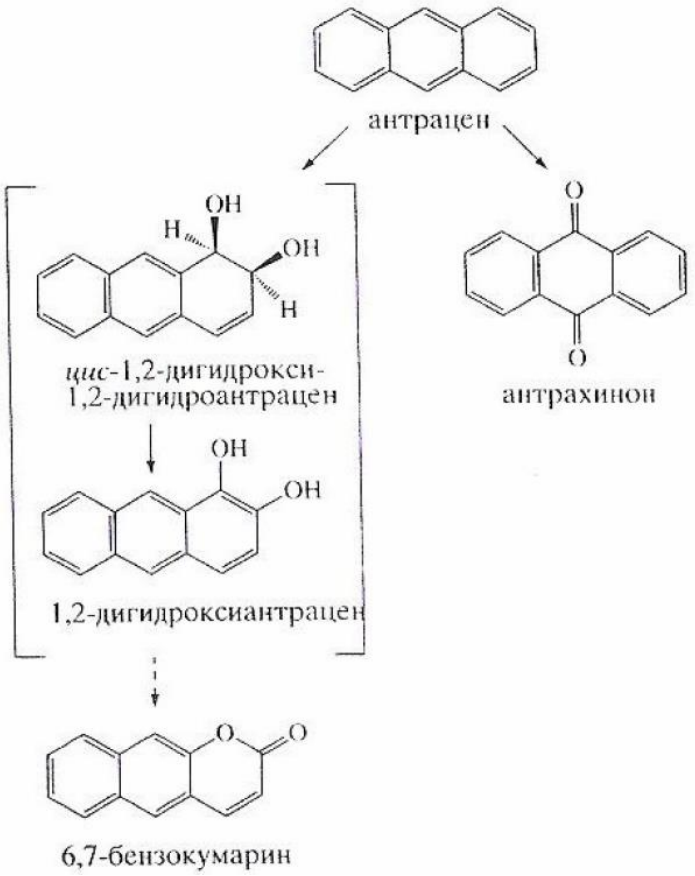
Схема превращения фенантрена штаммами: а - *R. rhodnii* 135, б - *P.fluorescens* 26K [101]:



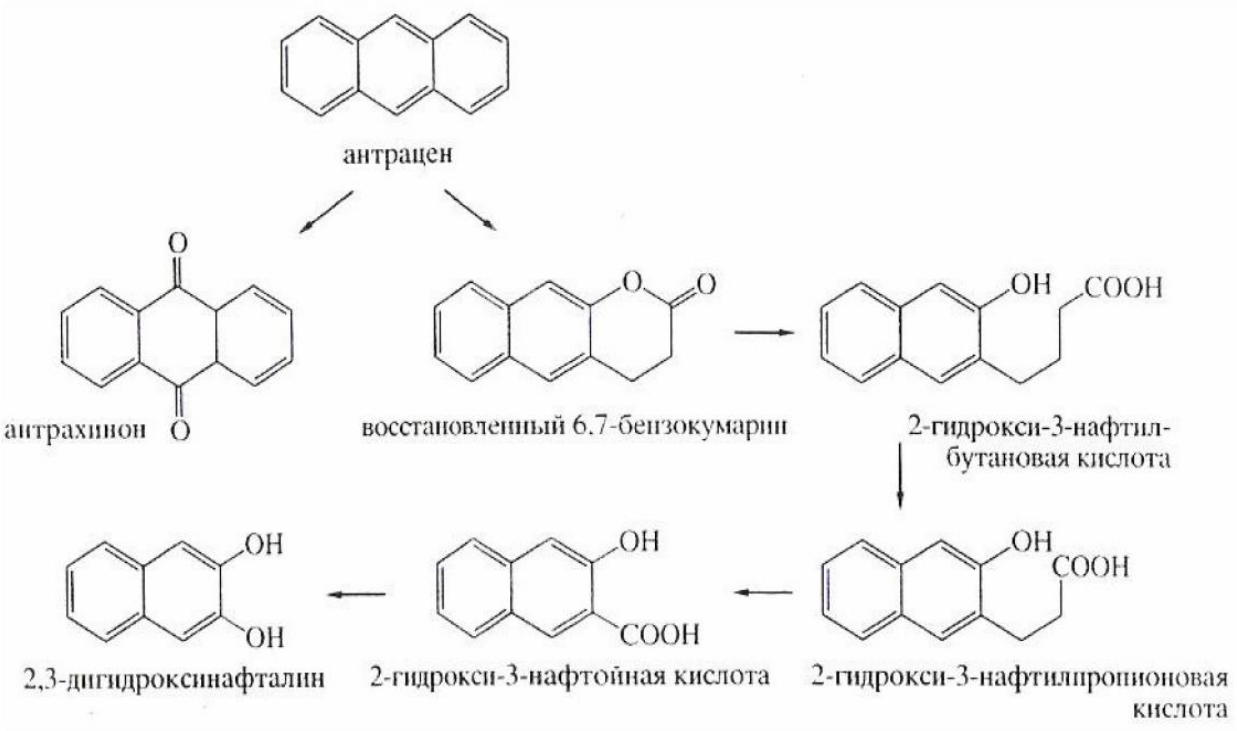
Биохимический путь утилизации фенантрена исследуемыми штаммами *P. putida* [105].

Окисление антрацена. При бактериальном окислении антрацена возможно образование нескольких продуктов. Один из них – антрахинон, часто обнаруживаемый в культуральной жидкости, накапливается в процессе и является тупиковым соединением, метаболизировать которое дальше бактериям не удается. Второй продукт – 6,7-бензокумарин – образуется в результате самопроизвольного замыкания кольца *цис*-1,2-дигидроксиантрацена (продукт экстрадиольного расщепления).

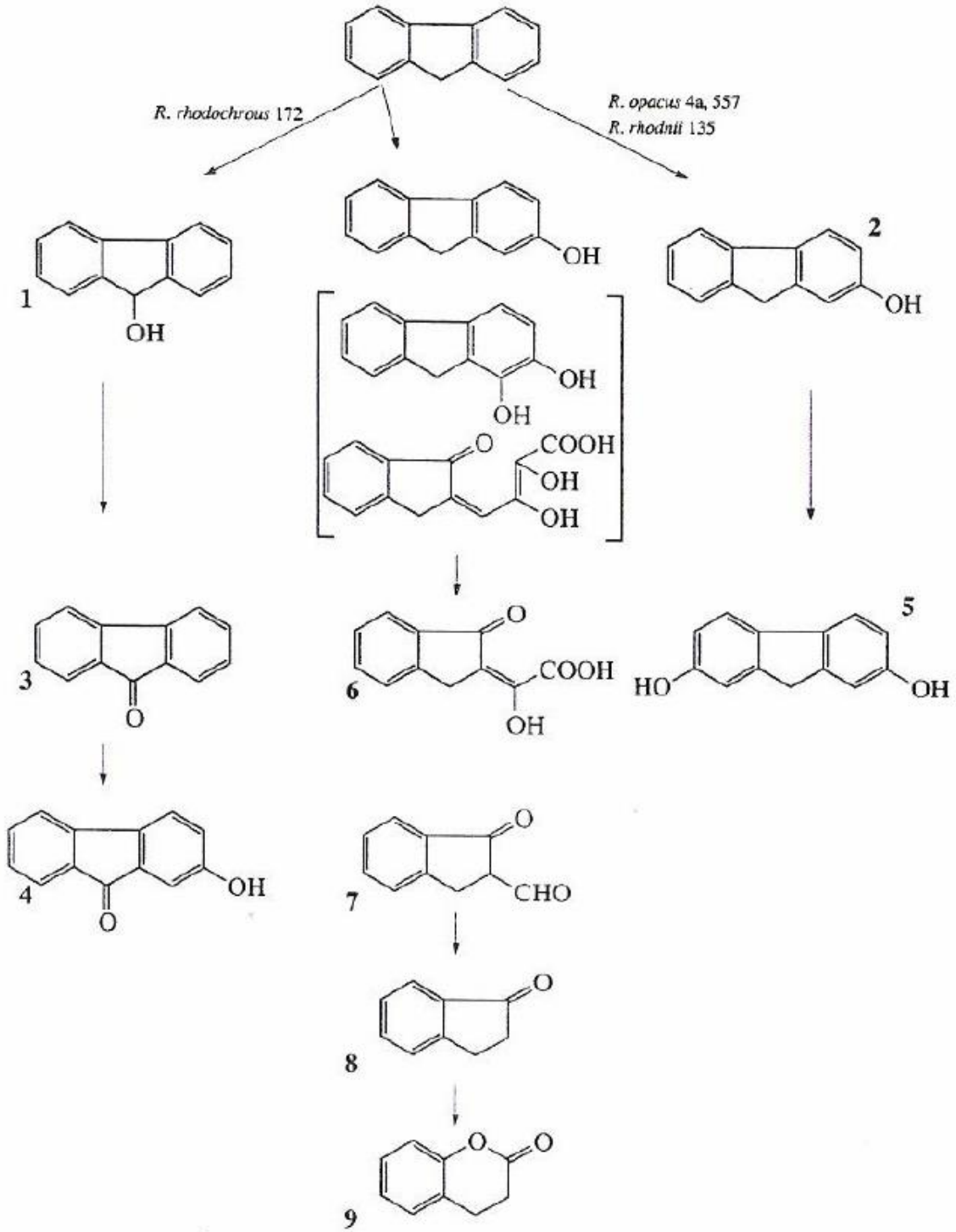
На основании исследований, проведенных Е. П. Розановой и С. И. Кузнецовым [106], в результате которых были выделены и идентифицировны промежуточные продукты окисления антрацена штаммом *R. opacus* 412, можно предположить два основных механизма частичного метаболизма антрацена. Вероятно, параллельно происходит окисление антрацена до антрахинона и его трансформация в *цис*-1,2-дигидрокси-1,2-дигидроантрацен, затем в 1,2-дигидроантрацен с последующим образованием конечного продукта - 6,7-бензокумарина [104, 107].



Кроме этого, было обнаружено, что антрацен окисляется *Pseudomonas fluorescens* 26K до 2-гидрокси-3-нафтойной кислоты. Кроме нее в культуральной среде были обнаружены 2-гидрокси-3-нафтилпропионовая и 2-гидрокси-3-нафтилбутановая кислоты, бензокумарин, 2,3-дигидроксинафталин и антрахинон, который не усваивается бактериями и накапливается со временем. При исследовании продуктов окисления антрацена бактериями рода *Arthrobacter* sp. K3, были идентифицированы те же промежуточные продукты. На основании полученных структурных данных, а также данных относительно концентраций полученных продуктов был предложен механизм метаболизма антрацена бактериями *Pseudomonas fluorescens* 26K и *Arthrobacter* sp. K3 [101]:



Окисление флуорена. *R. rhodochrous* и *R. opacus* могут метаболизировать флуорен полностью в течение 10-14 суток (с исходной концентрацией 12-25 мг/мл) и использовать его в качестве единственного источника углерода. Однако механизмы окисления различны [108]:



Возможные химические механизмы окисления флуорена родококками; **1** - 9-гидроксифлуорен; **2** – 2-гидроксифлуорен; **3** – 9-флуоренон; **4** – гидроксифлуоренон; **5** – дигидроксифлуорен; **6** – β-инданон-β-гидроксиуксусная кислота; **7** – формилинданон; **8** – 1-инданон; **9** – 3,4-дигидрокумарин

Деструкция асфальтенов и смол. Известно, что биодеградация тяжелых фракций нефти, содержащих смолы и асфальтены, затруднена их устойчивостью [95, 109] к воздействию ферментов и малой способностью диспергироваться в жидкой среде. Они содержат большое число

полиароматических соединений с конденсированными ядрами, среди которых относительно биодеградируемы только соединения с тремя и четырьмя ароматическими кольцами [110, 111]. Однако имеются сообщения об их высокой скорости окисления при оптимальных условиях [112,113].

В работе [114] были выделены микроорганизмы, активно деградирующие асфальтены (*Shewanella putrefaciens, Pseudomonas anguilliseptica, Micrococcus luteus, и Acinetobacter calcoaceticus*) и смолы (*Achromobacter xylosoxidans, Acinetobacter calcoaceticus*).

При биодеструкции смол и асфальтенов образуется небольшое количество масел. Это связано с отщеплением парафиновых фрагментов от молекул указанных соединений, происходящим под действием почвенных дегидрогеназ. Происходит постепенное разрушение каркаса смол, представленного высококонденсированными полициклическими ароматическими структурами, состоящими из десятков колец, соединенных между собой гетероатомными молекулами, содержащими серу, азот и кислород. В первую очередь биодеструкция смол протекает с отщеплением периферийных парафиновых структур, при этом ароматическое ядро окисляется с меньшей скоростью [110].

1.6 Характеристика микроорганизмов, способных трансформировать субстраты, и их ферментативная активность

1.6.1 Основные виды микроорганизмов, участвующих в разложении субстратов

Трансформация органических субстратов представляет собой динамический микробиологический процесс, в котором принимает участие огромное количество микроорганизмов [115].

Бактерии. Бактерии являются одними из самых активных деструкторов нефти. Им присуща способность к усвоению широкого спектра углеводородов, среди которых присутствуют и ароматические. Кроме того,

они представляют большой практический интерес благодаря способности к быстрому росту и простоте культивирования. Их спектр включает в себя бактерии различных родов. Это *Acetobacter*, *Acinetobacter* [116], *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Achromobacter* [117], *Halomonas* [118], *Pseudomonas* [119], *Aeromonas*, *Enterobacter* [120], *Serratia* [121], *Sarcina* [122], *Micrococcus* [123], *Bacillus* [124], *Clostridium* [125], сероокисляющие бактерии –*Thiobacillus*, оксигенные фототрофные бактерии *Nostoc* [126] и цианобактерии - *Agmenellum*, *Aphanocapsa*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Plectonema* [127-129].

Бактерии присутствуют на всех этапах трансформации лигноцеллюлозных субстратов, преобладая над грибами более чем в 40 раз [130, 131], но не оказывают значительного влияния на деструкцию растительных полимеров. Лишь представители нескольких родов способны разлагать целлюлозу. Среди аэробных целлюлолитических бактерий наиболее изучены роды *Cellulomonas* и *Pseudomonas* [132]. Использовать целлюлозу как субстрат для роста могут и многие из тех аэробных бактерий, которые можно назвать “всеядными”. Некоторые из них используют целлюлозу, по-видимому только в тех случаях, когда нет других источников углерода. Синтез и выделение целлюлаз у таких бактерий регулируется по типу катаболической репрессии. Обращает на себя внимание тот факт, что непосредственно целлюлозные бактерии в чистой культуре не способны разлагать древесину [133]. Они должны взаимодействовать с видами, не способными разлагать целлюлозу, но всегда сопутствующими целлюлозолитикам и питающимися продуктами их жизнедеятельности. В результате таких взаимодействий в аэробных условиях целлюлоза разлагается до углекислого газа и воды, а в анаэробных дополнительно образуется метан [134].

Вопрос о деструкции бактериями лигнина до сих пор остается открытым. Показано, что представители родов *Corynebacterium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Aerobacter* и *Enterobacter* могут

использовать лигнин в качестве единственного источника углерода, а бактерии рода *Clostridium* способны разлагать лигнин в анаэробных условиях [135].

Актиномицеты. Актиномицеты – группа микробов, более других бактерий приспособленная для деградации относительно устойчивых полимеров [136, 137]. В ходе метаболизма они способны образовывать меланины, являющиеся предшественниками гумусовых веществ в почве. Кроме того, они участвуют в деструкции почвенных минералов, влияют на формирование азотного баланса удобрения. Одной из основных функций актиномицетов считают реутилизацию микробной биомассы, а также поддержание равновесия микробного населения за счет производства антибиотиков. В биоценозах, подверженных нефтяным загрязнениям, наиболее часто обитают актиномицеты рода *Rhodococcus*, которые хорошо переносят воздействие неблагоприятных факторов, включая низкую температуру, утрафиолетовое излучение и отсутствие питательных веществ в течение длительного времени [138, 139]. Кроме *Rhodococcus* к нефтедеструкции способны *Nocardia* [125], *Mycobacterium*, *Streptomyces* [140, 141].

Актиномицеты играют важную роль в разложении растительных остатков, хотя и колонизируют лигноцеллюлозные субстраты медленннее, чем грибы и бактерии. Они являются строгими аэробами, поэтому выявляются в пределах 15 см от поверхности компоста [142]. Golueke [143] обнаружил в лигниновом компосте *Actinomycetes thermophilus*, *Streptomyces* sp. и *Micromonospora* sp.

Грибы. Многие виды мицелиальных грибов способны к деградации нефти (*Aspergillus*, *Acremonium*, *Penicillium*, *Mucor* [144], *Fusarium*, *Trichoderma*, *Candida* [145], *Debaryomyces*, *Endomyces*, *Endomycopsis*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* и *Trichosporon*), но наиболее активными считаются базидиальные, которые способны к разложению различных углеводородов нефти, включая полициклические

ароматические углеводороды [146, 147]. Важной особенностью базидиальных грибов является их способность к росту и развитию в неблагоприятных условиях. Так, было показано, что штамм *Lentinus (Panus) tigrinus* сохранял свою нефтеокисляющую активность как при недостатке, так и избытке азота в культуре [148], а штаммы *P. chrysosporium* и *P. pulmonarius* эффективно деструктировали ПАУ в почве в присутствии тяжелых металлов и при неблагоприятных для их роста значениях pH [149]. Показано, что инокуляция торфа *Steccherinum murashkinskyi* и *Trametes maxima* ускоряет разложение углеводородов нефти при пониженных температурах. Наибольшим деградационным потенциалом по отношению к алифатическим углеводородам нефти обладал *S. murashlinskyi*, а к ароматическим – *T. maxima* [150].

В тоже время основная экологическая роль грибов в биоценозах состоит в разложении трудногидролизуемых полимеров, синтезируемых растениями. Обладая очень развитым экстрацеллюлярным аппаратом, грибы могут использовать в виде единственного источника углерода такие неблагоприятные в метаболическом отношении субстраты, как лигнин, хитин, пектин, кератин и другие [151]. Все дереворазрушающие грибы можно условно разделить на три группы. Возбудители белой гнили повреждают все основные компоненты древесины, являются её наиболее мощными природными деструкторами. Полисахариды и лигнин обычно разрушаются ими одновременно, относительные скорости этих процессов зависят от вида грибов и условий их существования [152]. К грибам белой гнили, разрушающим прежде всего лигнин, относятся грибы родов *Phanerochaete, Trametes* и некоторых других [153].

Возбудители бурой гнили превращают древесину в красновато-коричневую массу; они разрушают главным образом целлюлозные и гемицеллюлозные компоненты древесины. Бурая гниль вызывается такими целлюлозоразрушающими грибами, как *Trichoderma, Coniophora*.

Грибы мягкой гнили вырабатывают ферменты, разрушающие все компоненты древесины [154]. Мягкая (умеренная, плесневая, ковровая) гниль, кроме представителей класса *Basidiomycetes*, вызывается многими видами из сумчатых и несовершенных грибов, встречающихся в цветной заболони или подпоре. Особую агрессивность эти грибы приобретают в условиях достаточной аэрации, повышенной влажности и температуры. К грибам мягкой гнили относятся представители родов *Armillaria*, *Chaetomium*.

1.6.2 Ферменты, участвующие в разложении органических субстратов

Микроорганизмы, способные разлагать растительные отходы, выделяют в окружающую среду целый набор ферментов, предназначенных для действия на полимеры растительной клетки [155]. В зависимости от вида растительного отхода (солома, опилки, ГЛ, навоз) спектр доминирующих ферментов будет меняться. Разложение компонентов нефти происходит в основном под действием оксидоредуктаз [156].

Гидролазы. Ассоциации микроорганизмов, деструктирующих целлюлозу в природных условиях, состоят из небольшого количества видов анаэробных и аэробных бактерий, в том числе миксобактерий, и из макро- и микромицетов, продуцирующих ряд работающих совместно ферментов из класса гидролаз [157]. Целлюлазы гидролизуют β-1,4-гликозидные связи целлюлозы. Традиционно, они разделены на эндоглюканазы и целлобиозогидролазы. Эндоглюканазы (эндо-1,4-β-глюканазы, ЭГ) могут гидролизовать внутренние связи (предпочтительно в аморфных участках целлюлозы), создавая новые терминальные звенья. Целлобиозогидролазы (экзо-1,4-β-глюканазы, ЦГ) действуют на существующие или созданные эндоглюканазой концы цепи. В результате действия ЦГ и ЭГ образуются молекулы целлобиозы. Эффективный гидролиз целлюлозы также требует β-глюкозидазы, которая разлагает целлобиозу с образованием двух молекул глюкозы [32]. Гемицеллюлозы биодеградируют до мономерных сахаров и уксусной кислоты. Гемицеллюлазы, как и большинство других ферментов,

классифицируются согласно действию на различные субстраты. Однако большого значения в биодеградации растительных отходов гемицеллюлазы не имеют.

Оксидоредуктазы. Лигнин и ароматические компоненты нефти разрушаются под действием различных оксидоредуктазных ферментов. Для разложения лигнина наиболее важными являются дегидрогеназы, тогда как арены нефти подвергаются моно- или диоксигеназным реакциям. В то же время показано, что ПАУ окисляются при действии Mn-пероксидазы, лигнинпероксидазы и лакказы [147, 158-160].

Лигниназа. В 1983 г. две группы исследователей сообщили о выделении из *P. chrysosporium* фермента, названного лигниназой (лигнинпероксидазой) [161, 162], который окислял модельные димеры лигнина и лигнин, как техногенный, так и нативный. Механизм превращений, осуществляемых лигниназой, подобен действию «классических пероксидаз» (пероксидазы из хрена), согласно которому реакция нативного фермента с H_2O_2 приводит к образованию окисленной формы фермента. К исходному состоянию фермент возвращается через два последовательных этапа одноэлектронного окисления субстрата, сопровождающихся образованием катион-радикалов субстрата [163]. Лигниназа - наиболее эффективная пероксидаза, она может окислять фенольные и нефенольные соединения, амины, ароматические эфиры и полициклические ароматические соединения с соответствующим потенциалом ионизации [164].

Mn-зависимая пероксидаза. Mn-зависимая пероксидаза была выделена одновременно с лигниназой из культуральной жидкости *P. chrysosporium.* Mn-пероксидаза окисляет Mn(II) до Mn(III). Она имеет конвертированный пероксидный каталитический цикл, но с Mn(II) в виде субстрата. Mn(II) должен быть хелатирован органической кислотой, которая стабилизирует продукт Mn(III) [165]. Поэтому, кроме перекиси и Mn(II), активность фермента зависит от присутствия лактата и других α-гидроксикислот.

Предполагается, что химическое окисление гидрохинонов, осуществляемое Mn(II), может быть необходимым для начальных ступеней биодеградации древесины, т. к. лигнинолитические ферменты слишком велики, чтобы проникнуть в немодифицированные клеточные стенки древесины [166].

Лакказа. Лакказа – медьсодержащий фермент, который катализирует удаление электрона и водородного иона из фенольной ОН-группы субстратов, в результате чего образуется соответствующий фенокси-радикал [167]. Далее ионы меди активного центра фермента регенерируются под действием молекулярного кислорода, а фенокси-радикал вступает в неферментативные реакции. Это могут быть реакции деметоксилирования, образования хинонов, окислительное элиминирование карбоксильных групп, что может вести к разрушению полимера. Однако это не доминирующие реакции. Наиболее характерной реакцией фенокси-радикалов является поликонденсация. Поэтому естественно, что реакции окислительной деструкции, катализируемые лакказой, сопровождаются поликонденсационными процессами [168]. Дереворазрушающие грибы - главные производители лакказы, но эта оксидаза была выделена из многих грибов, включая *Aspergillus* и термофильные грибы *Myceliophora thermophila* и *Chaemotium thermophilium* [169]. Недавно были найдены бактериальные лакказоподобные белки [170]. Эти ферменты полимеризовали низкомолекулярные, растворимые в воде органические фракции, изолированные из компоста, в высокомолекулярные продукты [171].

Активность лигниндеградирующих ферментов сильно зависит от состава культуральной среды для выращивания микроорганизмов. Хорошо известна репрессия деградации лигнина высоким уровнем азота в культуральной среде для грибов *Phanerochaete chrysosporium* и *Trametes versicolor*. В этом случае лигнолитическая активность проявляется только в течение стационарной фазы роста [172]. Кроме уровня азота, для стимуляции активности ферментов необходимо присутствие микроэлементов. В работе [173] исследовалось влияние Zn^{2+} и Cu^{2+} на активность оксидазных

ферментов *Phanerochaete chrysosporium*. Обнаружено, что активность ферментов максимальна при наиболее высоких уровнях обоих микроэлементов (18 мМ Zn^{2+} и 1.2 мМ Cu^{2+}), причем активация лигниназы Zn^{2+} более выражена. Стимулирующий эффект Zn^{2+} на продукцию лигниназы коррелировал с наиболее высокой скоростью минерализации лигнина.

Присутствие фенольных соединений или препаратов лигнина в культуральной среде грибов стимулирует также активность фенолоксидаз. Так, при добавлении лигнина к стандартной среде гриба *Stereum hirsutum* активность лакказы и пероксидазы возрастала в 2 раза [174].

Моно- и диоксигеназы. Оксигеназы - это ферменты, катализирующие включение атома или молекулы кислорода в субстрат окисления. Они служат для синтеза и деградации различных метаболитов. Все ферменты этого типа субстрат-специфичны, и у разных видов микроорганизмов за деградацию одного и того же типа углеводородов отвечают различные ферменты. Существуют фундаментальные различия в механизмах расщепления полициклических ароматических молекул, осуществляемых различными классами микроорганизмов [175].

Оксигеназы представлены двумя типами ферментов.

Монооксигеназы (оксигеназы со смешанной функцией, гидроксилазы, микросомальное окисление) катализируют присоединение одного атома кислорода к молекуле субстрата. При этом образуется гидроксильная группа, повышается растворимость вещества, и проявляются его новые свойства. Для работы монооксигеназной системы необходимы следующие основные компоненты: неполярный субстрат $R\text{-}CH_3$; кислород O=O; дополнительный субстрат НАДФН+ – донор атомов водорода. Следует отметить, что окисление органических соединений в монооксигеназных реакциях, в отличие от реакций митохондриального окисления, как правило, не решает никаких энергетических задач, а выполняет защитную (детоксикационную) и пластическую функции. С помощью монооксигеназ у микроорганизмов осуществляется аэробный метаболизм алканов. В частности, *Pseudomonas*

putida Gpo1 [176] обладает мембранно-связанной монооксигеназой, которая при помощи растворимого рубредоксина и рубредоксин-редуктазы шунтирует электроны через NADH к гидроксилазе для преобразования алканов в спирты [156].

Некоторые грибы способны окислять ПАУ с помощью цитохрома P-450 монооксигеназ посредством включения одного из атомов молекулы кислорода в ПАУ. Скорость деградации ими ПАУ, так же как и у бактерий, обратно пропорциональна числу колец в молекуле. Ферментативная атака колец ПАУ происходит только в аэробных условиях [102].

Диоксигеназы - ферменты, которые включают в субстрат оба атома молекулы кислорода. Таким путем окисляются циклические трудноокисляемые структуры, реакции идут с разрывом цикла. Множество штаммов нефтедеструкторов используют монооксигеназы или/и монооксигеназы и диоксигеназы для метаболизма моноциклических ПАУ [177]. Кроме того, классические диоксигеназные ферменты типа многокомпонентной диоксигеназы нафталина могут катализировать реакции моногидроксилирования, дигидроксилирования, дегидрирования, O- и N-деалкилирования и сульфоокисления у широкого спектра моноциклических и гетероциклических соединений [178].

1.7 Синтез микроорганизмами биологически активных веществ как способ симбиотического взаимодействия с компонентами биоценозов

Синтез фитогормонов. Основным отличием микробных фитогормонов от растительных можно считать то, что они не нужны самому микроорганизму. Данные соединения являются вторичными метаболитами, которые синтезируются нерегулярно и часто не имеют определенной физиологической функции [179]. Образование растительных гормонов считается одним из главных свойств ризосферных, эпифитных и симбиотических бактерий, стимулирующих и улучшающих рост растений,

так называемых PGPR-штаммов (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) [180-182]. При этом увеличивается площадь поверхности корневой системы, что благоприятствует размножению бактерий-колонизаторов [183-186]. В то же время, синтез фитогормонов характерен для фитопатогенов, продуцирующих их в сверхколичествах, нарушая тем самым гормональный статус растения и вызывая заболевание [187-189]. Фитогормоны производят также микроорганизмы, которые не связаны напрямую с растениями [190], и многие микроводоросли [191, 192]. Если синтез фитогормонов в фитопатогенных или PGRB-бактериях может объясняться их взаимодействием с растениями [193], то физиологическая роль таких соединений в метанотрофах, дрожжах, непатогенных микромицетах часто неясна [194, 195]. Многие фитопатогенные, а также микоризные грибы способны синтезировать индолилуксусную кислоту (ИУК). К ним относятся представители родов *Taphrina*, *Phytophthora*, *Ustilago*, *Colletotrichum*, *Laccaria*, *Pisolithus*, *Amanita*, *Rhizopogon*, *Paxillus*. Среди микромицетов ауксины производятся грибами рода *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Aspergillus* и *Penicillium*.

Наиболее изучен микробный синтез ауксинов, характерный не только для азотфиксирующих клубеньковых бактерий, но и для свободноживущих, в том числе патогенных микроорганизмов. Так, *Pseudomonas aurantiaca*, *Pseudomonas extremorientalis* [196] и *Klebsiella oxytoca* Rs-5 [197] способны при солевом стрессе синтезировать ИУК.

Известно, что растения корневыми выделениями сами способны стимулировать синтез ауксинов у микроорганизмов [199]. Продукцию ИУК можно увеличить, вводя в питательную среду триптофан [199, 200]. Бактериальный синтез ИУК в отсутствие растения свидетельствует о том, что этот фитогормон может выполнять и иные функции [194; 201]. Известно, что индолилуксусная кислота является предшественником других соединений, например, антраниловой кислоты, которая в свою очередь может быть регулятором экспрессии генов или межклеточным сигналом, аналогичным

ацил-гомосерин-лактону [183]. Имеются сведения, что образование ИУК можно рассматривать как процесс детоксикации триптофана, который является для прокариот токсическим соединением [202], о чем свидетельствует активация синтеза ауксинов клетками *A.brasilense, E.cloacae, P.putida* в условиях стресса (недостаток кислорода и источников углерода, переход в стационарную фазу роста и пр.) [183]. Исследования C. Bianco с соавторами [201] продемонстрировало, что ИУК способна изменять экспрессию генов *E. coli*. В этом исследовании показано, что гены, вовлеченные в центральные метаболические пути, такие как цикл трикарбоновых кислот, глиоксилатный шунт и биосинтез аминокислот (лейцина, изолейцина, валина и пролина), активировались ИУК.

В отличие от ауксинов, данных по образованию микроорганизмами цитокинина значительно меньше, хотя способность бактерий *Rhizobium leguminosarum* синтезировать эти фитогормоны *in vitro* известна с 1970-х годов [203]. В последнее время изучается синтез цитокининов симбиотическими азотфиксирующими бактериями родов *Sinorhizobium, Mesorhizobium* и *Bradyrhizobium* как вспомогательный механизм образования клубеньков [204, 205]. Однако бактериальный синтез цитокининов не является предпосылкой симбиотических отношений с растением, и решающая роль в этом процессе принадлежит растительным цитокининам [206]. Исследование [207] выявило прямую корреляцию между эффективностью симбиоза ризобиальных штаммов и уровнем синтеза цитокининов. Например, высокоэффективные штаммы симбионты сои *B. japonicum* УКМ в-6023 и *B. japonicum* УКМ в-6036 продуцирует широкий спектр цитокининов, в основном зеатин и транс-зеатин-рибозид. Неэффективный штамм *B. Japonicum* 604k синтезировал эти фитогормоны в значительно меньших количествах. Показано, что присутствие гормонпродуцирующих бактерий защищает растения от оксидативного стресса, о чем свидетельствуют более низкие количества малонового диальдегида, причем, наилучшее действие оказывали

цитокининпродуцирующие бактерии [208]. Существует два основных способа синтеза цитокининов в микроорганизмах [194]: *de novo* синтез изопентенилпирофосфата и аденозин-5´-монофосфата (характерно для фитопатогенных бактерий) и разрушение тРНК, в результате чего тРНК-изопентенилтрансферазой производится *цис*-зеатин. Этот путь чаще встречается в фитопатогенных грибах. Синтез цитокининов кодируется шестью генами, образующими оперон *fas* на плазмиде pFiD188 [209].

Синтезировать гиббереллины способны многие микромицеты, а представители рода *Fusarium* являются промышленными производителями гиббереллловой кислоты [210, 211]. Чаще всего это эндофитные грибы, выделенные из различных растений [212]. Интересно, что имеется обратная зависимость между патогенностью и фитогормональной активностью грибов. В работе [213] показано, что патогенный *Fusarium culmorum*, синтезирует в четыре раза меньше гиббереллина, чем симбиотический. Многие PGPR-штаммы также синтезируют гиббереллины [188, 214, 215].

Интересные данные получены Т. П. Пирог с соавторами [216]. Они установили способность продуцентов поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 и *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 синтезировать внеклеточные фитогормоны при культивировании на глицерине и этаноле. Концентрация ауксинов (84–140 мкг/л), цитокининов (3.5–364 мкг/л) и абсцизовой кислоты (0.9–3.6 мкг/л) зависела от природы источника углерода в среде культивирования штаммов и способа выделения (до или после экстракции ПАВ).

Синтез биосурфактантов. Биосурфактанты - структурно разнообразная группа поверхностно-активных веществ бактериального происхождения, которые образуются многими микроорганизмами.

Одной из основных сфер потребления биосурфактантов является нефтяная промышленность, которая использует препараты с минимальной очисткой, включая суспензию целых клеток. Показано, что при

использовании трегалозолипидов *Nocardia rhodochrous* нефтеотдача из подземных песчаников увеличивается приблизительно на 30 % [217]. Биосурфактанты применяют также в медицинской и косметической промышленности [218]. Показано, что сукцинил-трегалозный липид *Rhodococcus erythropolis* подавляет вирусы герпеса и гриппа. Софоролипиды, в свою очередь, ингибируют рост патогенов, а некоторые трегалозные липиды обладают противогрибковой и противовирусной активностью. Ксилолипиды микроорганизмов-пробиотиков *Lactococcus lactis* способны подавлять рост патогенных *Escherichia coli* и *S. aureus*. Показана и их противоопухолевая активность. Однако данный способ применения биосурфактантов находится на стадии разработки [219].

Не менее важной сферой примененения различных микроорганизмов, образующих биосурфактанты, являются технологии биоремедиации почв. Так, рамнолипид, продуцируемый *Pseudomonas aeruginosa*, удалял значительные количества разлитой нефти из галечного песка Аляски, загрязненного фирмой "Exxon Valdez". Показано также, что этот биосурфактант способен удалять до 25-70 % и 40-80 % углеводородов из загрязненной супеси и суглинков соответсвенно [220]. Кроме того, высокую эффективность биосурфактанты проявляют—в биоремедиации почв от тяжелых металлов (уран, кадмий и свинец), а также от фенантрена и полихлорированного бифенила [221]. Единственным недостатком биосурфактантов является высокая стоимость их производства.

Молекула биосурфактанта содержит гидрофильную часть, включающую аминокислоты или пептиды, либо моно-, ди- или полисахариды, и гидрофобную, состоящую из жирных кислот.

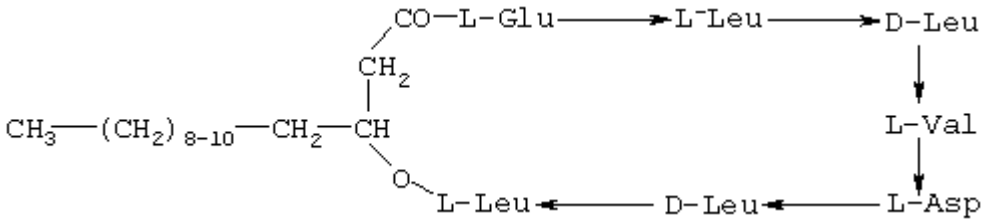
Состав биосурфактантов зависит от типа продуцирующего микроорганизма и может варьировать в зависимости от условий его культивирования [137]. Общепринятая классификация биоПАВ основана на их химической структуре:

1. гликолипиды (рамнолипиды – *Pseudomonas aeruginosa*; трегалозолипиды – *Rhodococcus erythropolis*, *Nocardia rhodochrous*, *N. erythropolis*, *Mycobacterium phlei*; софорозолипиды – *Torulopsis bombicola*, *T. ampicola*, *T. petrophilum*, *Candida* sp.);
2. липобелки и липопептиды (лихенизин – *Bacillus licheniformis*; сурфактин - *B. subtilis*; циркулоцины - *B. circularis*; полимиксины – *B. subtilis*; вискозин – *Pseudomonas fluorescens*; липосан – *Candida lypolytica*);
3. полисахариды (эмульсаны – *Acinetobacter* sp.*; Arthrobacter* sp.; *Phormidium* sp.; ксантан – *Xanthomonas campestris*);
4. жирные кислоты – *Candida* sp.; *Corynebacterium* sp.;
5. фосфолипиды – *Corynebacterium* sp.; *Candida* sp.

Особый интерес среди микроорганизмов, продуцирующих гликолипиды, вызывает *Rhodococcus* sp. Показано, что при росте на гексадекане он продуцирует демиколаты трегалозы [137]. В состав трегалолипидов родококков помимо миколовых кислот могут входить остатки других жирных кислот. С. Ланг и Дж. Филп [222] предложили пути биосинтеза трегалолипидов, согласно которым компоненты углекислоты и жирных кислот синтезируются независимо друг от друга и впоследствии проходят стадию этерификации. В то время как образование миколата является реакцией сложноэфирной конденсации Кляйзена двух жирных кислот, синтез трегалозо-6-фосфата катализируется трегалозо-6-фосфатсинтетазой, которая соединяет между собой два *D*-глюкопиранозильных фрагмента (C1 →C1'). Уридиндифосфат глюкозы и глюкоза-6-фосфат являются в этом цикле предшественниками. Исследованием гомологичных липидных фрагментов установлено, что липидный компонент (кориномиколовая кислота), образующаяся на одной из стадий, затем последовательно этерифицируется до α,α-трегалозы, образуя α,α'- трегалозо-6,6'-дикориномиколаты [223].

К микроорганизмам, продуцирующим липопептиды, относится, например, *Bacillus subtilis*. В этих биосурфактантах липиды связаны с

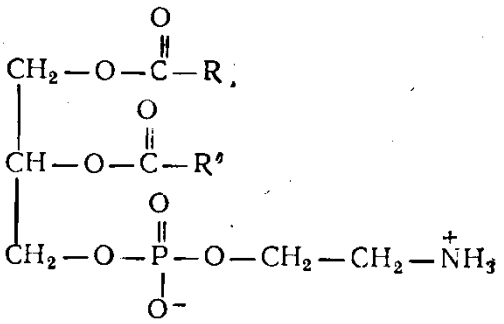
полипептидной цепочкой. *Bacillus subtilis* продуцирует сурфактин, представляющий смесь циклических гексапептидов, замкнутых в кольцо через β-гидрокси-жирную кислоту с углеродной цепью из 13-15 атомов [224]:



К третьей группе принадлежат бактерии рода *Acinetobacter*, продуцирующие биосурфактанты эмульсан и аласан [225]. Эмульсан способен эмульгировать легкие фракции нефти, дизельное топливо, сырую нефть и газойли. Аласан, являющийся высокомолекулярным комплексом белков и полисахаридов, хорошо стабилизирует различные масляно-водные эмульсии, включающие *н*-алканы (длина цепи десять и более углеродных атомов), алкилароматические углеводороды, жидкий парафин и сырую нефть [226].

Типичным представителем четвертой группы является *Corynebacterium lepus*, продуцирующая кориномиколовые кислоты [227]. Они относятся к поверхностно-активным веществам с варьирующимся числом атомов углерода. Смесь кориномиколовых кислот, выделенная из *Corynebacterium lepus*, показала значительное снижение поверхностного натяжения в водных растворах и межфазного натяжения в смеси вода-гексадекан в интервале pH от 2 до 10 [227].

К пятой группе относится *Acinetobacter* sp., который образует пузырьки, содержащие фосфатидилэтаноламин, способные формировать оптически чистые микроэмульсии алканов в воде [228]:



фосфатидилэтаноламин

Синтез антибиотиков. История антибиотиков насчитывает уже более 80 лет и до сих пор является состязанием между человеком, создающим новые антибиотики, и микроорганизмами, вырабатывающими механизмы устойчивости к ним.

Среди классических продуцентов антибиотиков можно выделить *Penicillium notatum, P. chrysogenum* и другие виды плесневых грибов, продуцирующие пенициллин, который подавляет рост стафилококков и мало токсичен для человека и животных [229]. Из молекулы пенициллина было получено её "ядро" (6-аминопенициллановая кислота), к которому затем химически присоединили различные радикалы. Так, были созданы новые «полусинтетические» пенициллины (метициллин, ампициллин и др.), не разрушаемые ценициллиназой и подавляющие некоторые штаммы бактерий, устойчивые к природному пенициллину. *Cephalosporium* sp. образует цефалоспорин С, обладаюший близким к пенициллину химическим строением, но имеющий несколько более широкий спектр действия. Из «ядра» молекулы цефалоспорина (7-аминоцефалоспорановая кислота) были получены его полусинтетические производные (например, цефалоридин), которые нашли применение в медицинской практике.

Первым антибиотиком из актиномицетов, получившим применение в медицине, был стрептомицин, подавляющий наряду с грамположительными бактериями и грамотрицательными палочки туляремии, чумы, дизентерии, брюшного тифа, а также туберкулёзную палочку. Молекула стрептомицина состоит из стрептидина (дигуанидиновое производное мезоинозита),

соединённого глюкозидной связью со стрептобиозамином (дисахаридом, содержащим стрентозу и метилглюкозамин).

К настоящему времени известно около 1000 антибиотиков бактериального происхождения. По химической природе почти все бактериальные антибиотики - полипептиды или белки. Особенность полипептидных антибиотиков, образуемых бактериями, заключается в том, что в их состав наряду с *L*-формами аминокислот входят *D*-аминокислоты. В медицине используют тиротрицин и грамицидин С из *Bacillus brevis*, бацитрацин из *Bac. subtilis* и полимиксин из *Bac. polymyxa* [229]. На сегодняший день остро стоит проблема поиска новых антимикробных веществ, к которым еще не выработалась устойчивость. Наиболее перспективным источником штаммов-продуцентов на протяжении десятилетий была почва, представляющая сложное сообщество организмов разных систематических групп, из которых самыми перспективными и хорошо изученными продуцентами были актинобактерии [230]. В настоящее время поиск расширяется, и исследуются самые разнообразные биоценозы, например, донные отложения, микробиота кишечника беспозвоночных, симбионты морских организмов, эндобионты растений, экскременты летучих мышей и др. [231-233]. При этом направление поиска продуцентов новых антибиотиков сместилось в сторону других, менее изученных по сравнению с актинобактериями, таксономических групп организмов, в том числе бактерий других таксонов [234]. Например, из вечной мерзлоты Антарктики выделены 7 штаммов, синтезирующих антибиотические вещества различного спектра действия, отнесенные к роду *Bacillus* (*B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. safensis*, *B. subtilis*) и *Gordonia terrae* [235]. Из надземных органов сорных и дикорастущих травянистых растений были выделены 20 изолятов 16 видов микромицетов альтернариоидных грибов. Результаты оценки их антимикробной активности показали, что более 70 % изученных грибов проявляют антибактериальную активность в отношении *Bacillus subtilis* и/или

Pseudomonassyringae, 30 % – антифунгальную против *Candida tropicalis* [236].

Продуцентами новых антибиотиков могут быть как ксилотрофные макромицеты родов *Trametes* и *Ganoderma* [237], молочнокислые бактерии из коровьего и кобыльего молока [238], так и ризосферные бактерии [239] и даже бифидобактерии [240].

Среди новых антибиотиков большой интерес представляют вещества пептидной природы, синтезировать которые способны многие бактерии. Так, *Bacillus pumilus* синтезировал фунгицидные и антибактериальные термостабильные и устойчивые к протеазам метаболиты пептидной природы. Показано, что штамм обладает выраженной активностью против *Aspergillus niger* и метициллин-резистентного штамма *Staphylococcus aureus* (MRSA) [241]. А для алкалофильных изолятов *Emericellopsis alkalina* выявлен синтез пептаиболов – группы нерибосомальных мембранноактивных антимикробных пептидов, обладающих специфичностью действия преимущественно по отношению к грибам-микромицетам [242]. Преимущество пептидов-антибиотиков перед традиционными антибиотиками – в меньшей способности стимулировать развитие резистентности [243]. Более новыми считаются бактериоцины, синтезируемые, в частности, некоторыми морскими микроорганизмами [244], а также летучие органические соединения и их сложные смеси, продуцируемые многими микроорганизмами [245].

Такое разнообразие синтезируемых соединений и микроорганизмов-продуцентов с одной стороны свидетельствует о потенциале микрофлоры, с другой – о кризисе современной антибиотикотерапии, связанной с растущей устойчивостью патогенов к существующим антибиотикам.

1.2 Трансформация органических субстратов как способ снижения антропогенной нагрузки на почвенные экосистемы

1.2.1 Переработка лигноцеллюлозных субстратов физико-химическими методами

Под термином лигнин подразумевают технические его формы, полученные извлечением из растительной ткани при помощи различных физико-химических методов и являющиеся отходами производства [246]. В ходе физико-химической переработки растительной ткани молекулярная масса лигнина уменьшается в несколько раз, а его химическая активность возрастает. Из раститительных тканей лигнин может быть выделен: растворением углеводных (полисахаридных) компонентов, например их гидролизом в присутствии минеральных кислот (сернокислотный и солянокислый лигнин); действием медноаммиачного раствора, представляющего собой р-р гидроксида тетраамминмеди (II) в 25 %-ном водном растворе аммиака $[Cu(NH_3)_4](OH)_2]$ (медно-аммиачный лигнин); окислением периодатом (периодатный лигнин); растворением самого лигнина (нагреванием в присутствии щелочи). В гидролизной промышленности получают порошковый т. н. гидролизный лигнин. В целлюлозном производстве образуются водорастворимые формы лигнина. Существуют две основные технологии варки целлюлозы, более распространенная сульфатная варка (щелочная) и менее употребляемая сульфитная (кислотная) варка. Лигнин, получаемый в сульфатном производстве, т. н. сульфатный лигнин в большой степени утилизируется в энергетических установках целлюлозных заводов. В сульфитном производстве образуются растворы сульфитных лигнинов (лигносульфонатов), часть которых накапливается в лигнохранилищах, а часть уходит со сточными водами предприятия в реки и озера. Специфика лигнина как сырья – постоянное накопление его запасов, образование техногенных месторождений, так как он почти не подвергается биохимическому окислению.

Промышленное использование лигнинов началось в конце XX века, и объемы продаж продуктов его переработки постоянно растут. Так, объемы продаж химикатов из лигнина в 1970 г. не превышали 50 млн долларов [247], а к 1996 г. составляли уже 600 млн долларов [248]. Среди областей применения лигнина есть и крупнотоннажные. Например, в строительстве для производства бетона, кирпича и сухой штукатурки используется более половины всех получаемых лигносульфонатов [249, 250].

Высокая поглотительная способность ГЛ обусловливает его хорошие сорбционные свойства, что позволяет получать из него эффективные, доступные и экологически безопасные сорбенты широкого спектра действия, способные практически количественно извлекать ртуть, золото, палладий и платину из водных растворов малой концентрации в широком интервале кислотности среды, а также неионогенные и анионные ПАВ [251]. Пиролиз ГЛ с различными добавками позволяет получать жидкие углеводороды [252, 253]. В настоящее время в медицине активно применяется энтеросорбент на основе ГЛ – препарат «Полифепан», а также разрабатываются новые фармакологические продукты. Например, запатентован лекарственный композиционный энтеросорбент повышенной адсорбционной способности, содержащий ГЛ, МКЦ, пектин и высокодисперсный диоксид кремния [254]. Тем не менее, доля используемых лигнинов незначительна. В мире в различных практических целях используется около 1 млн т из производимых 50 млн т [255], а наличие многочисленных вариантов утилизации лигнина является первым признаком отсутствия кардинального и всеобъемлющего решения проблемы [246].

Спектр технологий, позволяющих химически переработать опилки, существенно уже. Традиционно большая часть опилок прессуется в пеллеты [256, 257]. Однако эта технология требует высокого качества опилок и определенный тип котлов для котельных [258, 259]. Поэтому рентабельность достигается только за счет экспорта. Около 10 % опилок перерабатывается в древесную муку, востребованную во многих областях промышленности

[260]. Существуют методы создания керамического кирпича и легковесных огнеупоров, где в качестве отощающей и выгорающей добавки используют опилки [261]. Возможно создание нефтепоглощающих сорбентов при помощи гидрофобизации древесных опилок парафинами, выделенными из различных нефтешламов [262]. Несмотря на имеющиеся способы переработки, большая часть опилок никак не используется [2].

1.2.2 Методы очистки почвы от проливов нефти

К сожалению, до настоящего времени в России основным методом очистки почвы от нефти является ее выжигание. Однако сжигание нефти и продуктов ее переработки приводит к образованию чрезвычайно опасных загрязняющих воздух веществ. Кроме того, из-за неполного сгорания углеводороды могут постепенно проникать в водоносные горизонты почвы, вызывая возникновение долговременных экологических проблем [263, 264]. К физическим методам ликвидации загрязнений относятся: сбор, удаление и захоронение нефти и сильно загрязненной почвы, повышение влажности и улучшение аэрации почв путем рыхления поверхности на глубину корнеобитаемого слоя без оборота пласта, вспашки и дискования, промывка почвы водой под давлением, землевание, мульчирование слоем почвы, термообработка. Однако эти методы достаточно дороги и малоэффективны, поскольку собственно нефтепродукты из почвы не удаляются. Физические методы рекультивации не способствуют восстановлению плодородия почв, а скорее сами наносят дополнительный ущерб природе [265]. Механические процессы очистки заключаются в обваловке загрязнения, замене почвы и откачке нефтепродуктов в емкости, а также перемешивании и физическом разделении. Эти первичные мероприятия необходимы при крупных разливах нефти и нефтепродуктов, их осуществляют с помощью специального оборудования [266, 267], но они крайне дороги [268, 269].

Возможна обработка загрязненных почв в устройствах различного типа подогретыми водными растворами в присутствии поверхностно-активных

веществ или других химических реагентов; экстракция нефтепродуктов из почв различными растворителями, в том числе вакуумная экстракция и др.; известкование загрязненных нефтью грунтов – обработка грунта негашеной известью в количестве 0.5-5 % от массы разлитого нефтепродукта, в результате чего образуется твердый продукт, прочно удерживающий нефтепродукты в виде комплексных соединений [270]. Извлеченные с помощью физико-химических приемов загрязнения в виде растворов могут быть в дальнейшем переработаны, сконцентрированы и обезврежены, а очищенная почва возвращена на место [271].

Таким образом, с помощью физико-химических методов невозможно справиться с существующими проблемами утилизации органических субстратов. Поэтому экологически и экономически оправданным является применение биологических методов.

1.3 Применение биологических методов трансформации субстратов

1.3.1 Биологическая переработка лигноцеллюлозных отходов

При современной интенсивной системе земледелия очень остро встает проблема повышения плодородия почвы, обеспечения положительного баланса элементов питания и органического вещества. Большинство сельскохозяйственных угодий в РФ испытывает дефицит органических удобрений. Например, в Иркутской области вносится в 21 раз меньше необходимого их количества [272]. Следствием этого становится снижение урожайности сельскохозяйственных культур и ухудшение качества продукции. В последние годы намечается тенденция к увеличению количества органических удобрений, вносимых на поля. Так, в 2018 г. в Иркутской области было внесено на 25% больше органических удобрений, чем в предыдущем (350 тыс. тонн) [273]. Обычной практикой современного сельского хозяйства стало внесение только минеральных удобрений, что приводит к дополнительным потерям гумуса из-за повышения активности

почвенной микрофлоры, которая, при недостатке свежего органического вещества и достаточном количестве азота, удовлетворяет потребность в углероде преимущественно за счет разложения гумуса [274].

Привлекательно использование в виде органических удобрений нативных или модифицированных древесных отходов, не востребованных другими областями переработки. Рациональность этого пути заключается в том, что лигнин при переработке в удобрение частично превращается в гуминовые кислоты, составляющие основу гумуса почвы [275], следовательно, внесение древесных отходов в почву позволит вернуть ей утраченные в севообороте запасы гумуса, не нарушив сложившейся агроэкосистемы.

Основными положительными свойствами ГЛ и опилок, определяющими их ценность в качестве органического удобрения, является высокое содержание углерода и гумусообразующий потенциал, благоприятные физико-химические свойства, высокая сорбционная способность, а также хороший мульчирующий эффект. По агрохимическим свойствам лигнин приближается к верховому торфу [276], но, в отличие от последнего, в лигнине содержатся остаточные сахара (10-12 %) и ростовые вещества. Тем не менее, использование немодифицированных субстратов не рекомендуется, т.к. они обладают большой способностью к физическому и химическому поглощению минеральных веществ из-за наличия функциональных групп и большой поверхностной активности частиц. Установлено, что 1 т опилок способна физически и химически связывать весь азот, содержащийся в 1.8 т куриного помета и 42 л водного аммиака [277]. Поэтому требуется внесение высоких доз минерального азота, что провоцирует чрезмерное размножение почвенных микроорганизмов, дополнительно снижающее содержание гумуса в почве [278]. Отрицательное влияние лигноцеллюлозных отходов также может быть вызвано наличием или быстрым высвобождением в процессе почвенной микробной деградации биологически активных веществ. Прежде всего, это низкомолекулярные фенольные соединения. Так, малые

количества коричной, кумаровой, салициловой и бензойной кислот, являющиеся продуктами распада лигнина, ингибируют рост растений, а многие фенолкарбоновые кислоты токсично влияют на прорастание семян [279]. Для нейтрализации негативных свойств удобрений на основе лигноцеллюлозных отходов используют различные добавки.

Питательную ценность удобрений на основе лигноцеллюлозных отходов повышают внесением как минеральных, так и органических компонентов. Так, предложен способ получения органического удобрения на основе ГЛ с добавлением суперфосфата, извести, хлористого калия и азотсодержащего компонента, в качестве которого используют аммиачную селитру и аммофос [280]. Растительное сырье, обогащенное азотом из птичьего помета, обладает высокими удобрительными качествами и служит для одновременной утилизации отходов птицефабрик и гидролизной промышленности. Для производства удобрения допускается использование исходного жидкого помета, так как ГЛ или опилки в силу своей высокой влагоемкости способны поглотить избыточную влагу [281, 282]. Эти способы применимы и для других отходов животноводства [283].

Еще эффективнее обогащают почву органическими и минеральными веществами сложные смеси. Так, предложено многокомпонентное удобрение, содержащее торф, опилки, сухой птичий помет, ГЛ, материнский слой земли, водный раствор аммиака, минеральные добавки и стимулятор [284].

Большинство из описанных удобрений успешно прошли сельскохозяйственные испытания. Однако наряду с данными о положительном влиянии лигноцеллюлозных отходов на урожайность и качество возделываемых культур в литературе встречаются сведения об их негативном влиянии. Например, внесение ГЛ в легкосуглинистые почвы (Узбекистан) в дозе 60 т/га на фоне $N_{350}P_{250}K_{150}$ показало за 5 лет наблюдений снижение урожая хлопка-сырца с 0.8 до 0.04 т/га [285]. Имеются сведения об ухудшении структуры и механического состава почвы из-за цементирующей

способности ГЛ [286]. Выявлено подавление прорастания семян кукурузы и гороха, угнетение роста и ухудшение качества зерна пшеницы после внесения ГЛ в почву [287].

Очевидно, что для получения полноценного удобрения на основе лигноцеллюлозных отходов простого смешивания их с минеральными или органическими добавками недостаточно. Наилучшим вариантом получения удобрения на основе ГЛ или опилок является компостирование [288].

Компостированию можно подвергать практически все лигноцеллюлозные отходы: ГЛ, опилки, щепу, кору и т.д. Существует множество вариантов получения удобрений из таких лигноцеллюлозных остатков. Для повышения содержания азота возможно смешивание их с птичьим пометом [276]. Создание лигнопометного компоста является экономически целесообразным в регионах, имеющих достаточное количество обоих отходов. При приготовлении удобрения возможна замена помета на навоз крупного рогатого скота. Так, Г. С. Король с соавторами [289] разработали компост, состоящий из ГЛ, предварительно нейтрализованного доломитовой пылью или мелом, гидролизного шлама и навоза. Введение в компостируемую смесь гидролизного шлама способствовало образованию пористых комкообразных агрегатов, что приводило к уменьшению содержания в удобрении частиц менее 1 мм, кольматирующих его поры и капилляры. Замена птичьего помета на хитин, хотя и удлиняет продолжительность компостирования, при внесении в почву значительно улучшает ее фитосанитарное состояние, способствуя пролиферации грам-положительных бактерий, являющихся антагонистами фитопатогенных оомицетов [290].

В природных условиях функция вовлечения древесных остатков в круговорот углерода принадлежит в первую очередь грибам [291], в образовании гуминовых кислот решающую роль играют актиномицеты [292]. Так, введение, например, инокулята культуры *Pleurotus djamor* PD-3.2 [293], ускоряет твердофазное компостирование сосновых опилок, но требует

большого внимания к аэрации (перемешивание необходимо проводить ежесуточно).

Применение монокультуры даже самого высокоактивного микроорганизма не обеспечит полноценной переработки отходов древесины, т.к. в природе этот процесс многостадийный, и ассоциации микроорганизмов всегда будут более эффективными [294]. Ученые из КНР предлагают использовать для переработки отходов деревообрабатывающей промышленности и обогащения готового продукта азотом свободноживущий азотфиксатор *Azotobacter* sp. MIG и целлюлозолитический микроорганизм *Trichoderma viride* CCTCC AF 95252 [295]. Отмечается синергизм указанных микроорганизмов, улучшается качество компоста, возрастает содержание азота.

В качестве суспензии микроорганизмов используют и активный ил, являющийся отходом биологической стадии очистки сточных вод сульфатно-целлюлозного производства [296]. Повышение эффективности такого удобрения достигается путем увеличения степени деструкции лигнина с образованием гуминовых, фульвокислот и гуматов, которые, попадая в почву, постепенно разрушаются, обеспечивая пролонгированное действие удобрения.

Скорость компостирования можно увеличить добавлением в компостируемую массу хорошо перепревшего навоза или хорошо созревшего старого компоста в количестве 10-20 % от исходного материала. В перепревшем навозе и компосте обитает естественным образом сложившаяся микробная ассоциация из целого комплекса микроорганизмов, принимавших участие в ферментации органических остатков и образовании гумусовых соединений из продуктов разложения [297]. Однако наибольшей эффективностью обладает так называемая «компостная закваска», изготавливаемая из специально подобранных лигно- и целлюлолитических микроорганизмов [298], что инициирует начало компостирования

лигноцеллюлозных субстратов и способствует протеканию биохимических реакций в нужном направлении.

Повышенное внимание к внедрению органических удобрений естественного происхождения (в том числе древесных отходов) согласуется с современной тенденцией «органического сельского хозяйства», получившей широкое распространение в развитых странах. Использование компостов на основе лигноцеллюлозных отходов способно решить одновременно две серьезные экологические задачи: ликвидация крупнотоннажных отходов и повышение плодородия почв.

Использование правильно приготовленных компостов способно значительно увеличить урожайность сельскохозяйственных культур. Так, разработанный в Институте биологии Коми НЦ УрО РАН компост, содержащий лигнин и помет в соотношении 1:1 [299], увеличивал урожайность многолетних трав на 15-83 % в зависимости от дозы вносимого удобрения. На естественных кормовых угодьях лигнинопометные компосты резко улучшили ботанический состав травостоя. Содержание в нем тимофеевки луговой повышалось с 17 до 41 %, райграса – с 16 до 37 %, исчезли лютик едкий, хвощ, щавель и другие малоценные травы [300, 301]. Применение компостированных в течение двух лет отходов кофейного производства увеличивало масличность семян льна при росте их урожайности на 4.7 ц/га по сравнению с контролем, снижало концентрацию тяжелых металлов в льнопродукции, улучшало плодородие дерново-подзолистой супесчаной почвы [302]. При применении сложных компостов, содержащих измельченные кукурузные кочерыжки, глинистые отложения реки Терек и молибденсодержащие промышленные отходы, отмечалось увеличение урожайности сои и кукурузы, выращиваемых на зерно [303]. В работах [304] показано, что применение компостов на основе древесных опилок повышало урожайность картофеля сорта Адретта на 40 % относительно контроля. Плотность почвы на опытном участке снижалась с 1.4 г/см^3 до 1.1–1.2 г/см^3 . Во время летних осадков почва с внесенным

компостом требовала существенно меньше рыхления и была менее склонна к коркообразованию.

Имеются данные о применении продукта биотехнологической переработки ГЛ в качестве биологически активного гранулированного удобрительно-посевного материала, а также органического сорбента для рекультивации загрязненных нефтью земель [305]. Свойства подобного компоста могут быть усилены внесением минеральных элементов питания растений, ростовых и других физиологически активных веществ, а также микробиологических препаратов (в частности, азотфиксаторов). Полевые опыты показали, что применение такого компоста улучшает формирование одернованного гумусового слоя в условиях техногенно-нарушенных и посттехногенных почв Крайнего Севера.

Возможно применение компостов для улучшения укоренения саженцев ценнных пород деревьев. Так, использование для культивирования дуба черешчатого различных компостов показало увеличение всхожести и листовой массы сеянцев при применении субстрата на основе навоза КРС [306]. Еще одним положительным качеством компостов является улучшение фитосанитарного состояния почвы. Показано, что добавление микопродукта, полученного путем биоконверсии сосновых опилок, в почву питомника позволило увеличить сохранность и качество лесопосадочного материала, продуктивность (биогенность) почвы и время активности внесенных (с семенами хвойных) микробов-антагонистов [307].

По своим удобрительным свойствам компосты на основе ГЛ аналогичны удобрениям, получаемым на основе торфа, а по действию на урожай не уступают навозу. В то же время органоминеральные компосты на основе лигноцелллюлозных отходов отличаются длительным последействием, повышая урожай растений на второй и третий год после внесения удобрений [308]. Даже через 4 года после внесения отмечается положительное действие компостов на физико-химические свойства почвы. Так, уменьшалась плотность пахотного слоя, снижалась гидролитическая

кислотность, а содержание обменных катионов увеличивалось [279]. В условиях Московской области в 17-летнем опыте установлено длительное последействие высоких доз компостов из осадков сточных вод с древесными опилками при возделывании злаковых многолетних трав [309]. Наибольшее повышение укосов сена, составляющее 39-47 % по отношению к контролю, отмечено при применении 35 т/га компоста.

1.3.2 Биоремедиация загрязненных нефтью почв

Под биоремедиацией понимают использование природных микроорганизмов для эффективного разложения загрязняющих веществ в окружающей среде [298, 310, 311], являющейся ценной альтернативой физическим и химическим методам очистки [312]. Основные преимущества метода - эффективность, экономичность, экологическая безопасность, отсутствие вторичных загрязнений. В процессе своей жизнедеятельности микроорганизмы способны поглощать и метаболизировать органические загрязнители, способствуя разложению загрязняющих веществ до диоксида углерода и воды [313-317].

Существует два типа биоремедиации: *ex situ* и *in situ*. Биоремедиация *ex situ* проводится вне места загрязнения. Методы биоремедиации с вывозом нефтезагрязнённых почв имеют ряд существенных преимуществ, таких как повышенный контроль за рекультивируемой почвой и оптимизация процесса. Существенными недостатками данного метода являются высокие затраты и вывод из хозяйственного оборота значительных площадей, так как загрязнённая почва извлекается, подвергается биоремедиации в специальных устройствах и возвращается в место загрязнения.

Биоремедиация *in situ* проводится непосредственно в месте загрязнения [318-320] и является комбинацией двух основных подходов: биостимуляции и биодополнения (биоаугментации) [321].

Метод биостимуляции основан на активизации метаболизма углеводородокисляющей микрофлоры [322]. Для ускорения темпов

ремедиации загрязненной среды необходимо создать условия, оптимальные для роста и развития микроорганизмов-деструкторов (аборигенных или интродуцированных). Прежде всего - это аэрация почв, которая заключается в рыхлении почвы и ее перемешивании. Создание оптимального температурного режима, например, использование темной полиэтиленовой пленки в зонах с умеренным и холодным климатом, а также методы зачернения поверхности почвы: использование сажи, угля. Поддержание необходимой влажности - в зависимости от типа почвы, оптимальная влажность колеблется в диапазоне 60-65 %. Регулирование кислотности - значения pH близкие к нейтральным являются оптимальными для роста углеводородокисляющих микроорганизмов.

Для ускорения деструкции нефтяных загрязнений применяют минеральные удобрения [323, 324] например, нитроаммофоску, содержащую азот, фосфор, калий, а также органические удобрения, сурфактанты (поверхностно-активные вещества) [316, 324], навоз, отработанный грибной компост, кукурузу [325-327].

Биоаугментация - это добавление в природную среду адаптированных к загрязнителю активных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов или биопрепаратов на их основе с одновременным внесением биогенных элементов [328-330]. Ее применяют в случаях, когда концентрация загрязнителя в почве или относительно высока (аборигенная микрофлора не справляется с количеством загрязнителя), или низка (аборигенная микрофлора не справляется с качеством загрязнителя); загрязнитель – устойчивое соединение, которое плохо поддаётся разложению естественной микрофлорой даже в том случае, если для неё созданы оптимальные условия роста или загрязнитель попал в почву в результате недавнего разлива органических соединений [331-333].

Зачастую совместно с биоремедиацией проводят фиторемедиацию, заключающуюся в использовании растений для очистки почвы благодаря их

способности извлекать токсичные вещества из окружающей среды или превращать их в безопасные метаболиты [334-337].

На основе микроорганизмов-деструкторов созданы и создаются биопрепараты, предназначенные для очистки почв и воды от нефтяных загрязнений. Подбор бактерий-деструкторов, как правило, основывается на их способности к интенсивному росту на питательных средах с индивидуальными углеводородами или сырой нефтью в качестве единственного источника углерода. Известны биопрепараты, созданные на основе бактериальных монокультур или состоящие из нескольких штаммов. Поскольку нефть представляет собой смесь различных компонентов, целесообразно использовать «коктейль» из микроорганизмов для осуществления ремедиации [338].

Были созданы препараты на основе следующих микроорганизмов: *Pseudomonas* (Псевдомин, Путидойл, Эконадин), *Acinetobacter* (Аллепро, Олеоворин, Биодеструктор, Дестройл), *Rhodococcus* (Родотрин, Родер, Руден, Гера), *Bacillus* (Бациспецин), *Arthobacter* (Торнадо) На основе консорциума микроорганизмов имеются: *Pseudomonas, Rhodococcus* (Деворойл, Накойл-1), *Bacillus, Arthrobacter* (Ленойл), *Mycobacterium, Pseudomonas* (Нафтокс), *Micrococcus, Arthrobacter* (Биосет), *Bacillus, Rhodococcus, Providencia* и *Citrobacter* (СОВЕ-10). Однако информация о препаратах крайне ограничена и псуществует, в основном, на уровне реклам [59, 62, 271].

Перечисленные препараты выпускаются в трех основных формах: жидкая (несепарированная биомасса после ферментации с массовой долей влаги до 99 % и титром 10^7–10^8 КОЕ/мл); пастообразная (сепарированная биомасса с массовой долей влаги до 30 % и титром до 10^9–10^{10} КОЕ/мл); сухая (лиофилизированная или распылительно-высушенная в токе теплого воздуха биомасса с влажностью 3-5 % и титром 10^9–10^{11} КОЕ/г).

Единой и стандартизованной методики оценки эффективности действия препаратов на основе микроорганизмов или биопрепаратов, применяемых

для ремедиации почвенных экосистем, не существует в силу специфики области применения каждого препарата и особенностей как почвенного состава, так и углеводородного состава нефти. Эффективная деструкция различных углеводородов микроорганизмами, внесенными в почву (или воду) с препаратом, возможна лишь в тех случаях, если они найдут в почве (или других средах, в которые будут помещены) благоприятные условия для жизнедеятельности и развития (источники питания, необходимый тепловой и водный режимы и т. д.). Очень большое значение для жизнедеятельности нефтеокисляющих микроорганизмов имеет и качественный состав нефтяного сырья, попавшего в почву (или другую среду), и время, прошедшее с момента загрязнения. Различные фракции нефтепродуктов, их сочетания по-разному влияют на микроорганизмы, в том числе внесенные с биопрепаратами, что определяется их физиолого-биохимическими особенностями [338].

* * *

За последние несколько десятилетий в нашей стране и за рубежом было выполнено много работ, касающихся возможности биодеградации нефти и лигноцеллюлозных отходов. Несмотря на все исследования, направленные на решение этой экологической проблемы, до сих пор нет достаточно эффективного способа, позволяющего быстро и в полном объеме переработать образовавшиеся загрязнители. Существующие методики либо обладают определенными недостатками, либо их невозможно воспроизвести в других условиях. Например, длительный срок трансформации не подходит для сибирских регионов, т. к. отрицательные температуры окружающего воздуха замедляют микробные процессы. Проблемы синтеза биологически активных веществ микроорганизмами, участвующими в биотрансформации органических субстратов, в литературе обсуждаются недостаточно. Все эти задачи требуют своего решения для понимания происходящих при компостировании процессов и целенаправленного получения конечного продукта с прогнозируемыми свойствами.

2 Объекты и методы исследования

2.1 Компостирование лигноцеллюлозных отходов

В качестве субстрата для приготовления удобрения (компостирования) использовали гидролизный лигнин и древесные опилки.

Для компостирования применяли смесь свежих опилок из древесины лиственных и хвойных пород деревьев с влажностью 10.9 %, $pH_{вод.}$ 5.6, pH_{KCl} 5.9, элементный состав (%): C - 53.9, N - 3.4, H - 6.7 (источник опилок – лесопилки, расположенные в различных регионах России).

Для скрининга из музейной коллекции микроорганизмов ИрИХ СО РАН выбрали 21 штамм высших грибов, относящихся к разным классам. Оценка способности роста грибов на стерильных опилках проводилась через месяц культивирования. Степень биологического обрастания опилок оценивали по шестибалльной шкале согласно ГОСТ 9.048-91 [339]. Основным критерием отбора культур для дальнейшей работы было изменение внешнего вида опилок (почернение древесных остатков и изменение их текстуры). Для выбранных культур проводили тесты на совместимость, в которых использовали радиальный метод подсева испытуемых грибов к предварительно выросшей колонии исследуемого гриба на твердой среде Сабуро [45]. В дальнейшем использовались следующие культуры: *Acremonium* sp., *Phanerochaete chrysosporium* Burds. 1 MR-1 (Институт водных и экологических проблем ДВО РАН, г. Хабаровск), *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Pilat, предоставленный Д. И. Стомом (НИИ биологии при ИГУ, г. Иркутск), *Phanerochaete chrysosporium* Burds. ATCC-24725 (ВНПО Гидролизпром, г. Санкт-Петербург), *Sporotrichum pulverulentum* (конидиальная стадия *P. chrysosporium)* Novobr. 1767 (ВКМ, г. Пущино).

Лабораторное компостирование проводили в течение 3 месяцев в термостатируемых условиях (26 ^{o}C). Во всех случаях пятисуточный

инокулят, выращенный на жидкой среде Кирка [340], вносили в стерильные опилки, увлажняя их до оптимальной влажности (60-70 %). Критериями качества компоста служили убыль лигнина и целлюлозы компостной массы, индекс ксилолиза, фитотоксичность, соотношение C/N готового компоста.

Промышленное компостирование опилок проводили в буртах при естественном увлажнении и аэрации в различных регионах:

1. На базе лесопилки, принадлежащей ООО «Компания «Северный лес», в 2008 г. для компостирования были предоставлены свежие осиновые опилки в количестве 60 м^3 (приложение 1, 2).
2. В рамках совместного проекта СО РАН - Забайкалью на городской лесопилке г. Чита, лиственница с небольшими включениями сосны, 30 м^3, 2010 г.
3. На базе полигона ТБО г. Иркутск, смесь сосна-лиственница, 30 м^3, 2014 г.
4. На базе лесопилки, принадлежащей «Крестьянскому фермерскому хозяйству Филимонов И. В.», для компостирования использовали смесь опилок сосна-ель, 60 м^3, 2018 г. (приложение 1, 2).

Во всех случаях закладку свежих древесных опилок проводили в теплое время года (май – начало июня) на открытых площадках, свободных от древесной и кустарниковой растительности. Опилки обрабатывали 4 кг/т доломитовой муки, вносимой вручную с перемешиванием мотокультиватором или трактором с ножом. К смеси добавляли воду до достижения влажности 60-65 % и оставляли на двое суток для нейтрализации. Затем вручную вносили минеральные добавки: нитроаммофоску (N/P/K 17/17/15) - 8 кг/т и мочевину - 8 кг/т. В варианте компоста 4 вносили 7 кг/т нитроаммофоски и 4 кг/т мочевины. Микроорганизмы, состав которых приведен выше, выращивали индивидуально на жидкой питательной среде Сабуро, затем смесь стерильно высушивали на цеолите (размер гранул 3-5 мм) до влажности не более 10 %. Получившуюся смесь вносили одновременно с минеральными добавками в количестве 1-2 кг/т. Опилки с минеральными добавками и микробной

ассоциацией перемешивали трактором с ножом и формировали бурт высотой до 2.5 м. Температуру на глубине 60-70 см измеряли ежедневно в течение первой недели компостирования. Перемешивание созревающего компоста проводили через 3-5, 8-10, 12-14 недель компостирования путем перемещения слоев бурта при помощи трактора. При первом перемешивании вручную вносили 4 кг/т доломитовой муки для поддержания оптимальной кислотности субстрата. Через 3-4 мес. компостирования отбирали пробы на анализ с глубины 0-10, 20-30, 50-60 см в 20 точках по всему периметру бурта и усредняли. Масса средней пробы составила 2 кг.

Компостирование гидролизного лигнина. ГЛ отбирали на Зиминском гидролизном заводе сразу после стадии гидролиза древесины (1999 г.). Влажность ГЛ составляла 75 %, $pH_{вод.}$ 2.8, pH_{KCl} 2.55, элементный состав (%): C - 62.7, N - следы, H - 5.2, зола – 5.4.

Закладку ГЛ на компостирование проводили на открытых площадках в конце мая в виде буртов. Компостирование осуществляли в течение 13 недель. В состав ассоциации входили *Trichosporon cutaneum (beigelii)* D-46, *T.cutaneum* 5, *Streptomyces asterosporus*, предоставленные чл.-корр. НАН Беларуси Э. И. Коломиец (Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск), *Penicillum citreo-viride, Acremonium* sp., *Phanerochaete chrysosporium* Burds. 1 MR-1, предоставленные д.б.н. Тен Хак Муном (Институт водных и экологических проблем ДВО РАН, г. Хабаровск).

Культуры выращивали на жидких средах в течение 5 сут. (*T.cutaneum* - на среде для дрожжеподобных грибов [341], *S.asterosporus* - на среде для лигнинолитических актиномицетов [342], *P.citreo-viride, Acremonium* sp. - на среде Кирка для грибов [340], затем смесь микроорганизмов, взятая в равных объемах, инокулировались в 50 кг увлажненных до 65 % отрубей для накопления биомассы («закваска»).

На 3 т субстрата вносили 36 кг извести, 27 кг аммофоса, 21 кг калия хлористого, 75 кг сульфата аммония и 50 кг «закваски», приготовленной по методу [343].

Компостируемую смесь перемешивали через 3, 7, 10 нед. после закладки. Показателем для необходимости перемешивания служило снижение температуры в центральной части компостного бурта до 30-35 °С.

Пробы компоста для анализа отбирали каждую неделю с глубины 0-10, 20-30, 50-60 см в 20 точках по всему периметру бурта и усредняли. Масса средней лабораторной пробы составляла 2 кг.

Температуру измеряли на глубинах 0-10, 30-40, 60-70, 90-100 и 120-130 см от поверхности на освещенной и теневой сторонах бурта. Кислотность солевой и водной вытяжки определяли на универсальном иономере ЭВ-74 в соответствии с [344].

Численность микроорганизмов учитывали методом предельных разведений – бактерий на мясопептонном агаре (МПА), грибов - на среде Сабуро, актиномицетов - на среде Чапека, аэробных целлюлозолитиков - на среде Гетчинсона с фильтровальной бумагой, термофильных микроорганизмов - на среде Космачева. Количество аммонификаторов определяли на мясопептонном бульоне, накопление аммиака выявляли по посинению лакмусовой бумажки, выделение сероводорода - по почернению фильтровальной бумаги, пропитанной раствором уксуснокислого свинца. Число денитрификаторов учитывали на среде Гильтея, выделение газа регистрировали с помощью поплавков. Нитрификаторы выращивали на среде Виноградского, образование NO_2 фиксировали по крахмало-йодной реакции, NO_3 – по реакции с дифениламином [45]. Определения проводили в 3-4 повторностях. Достоверность результатов учета количества микроорганизмов оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни.

Ферментативную активность в компостах и почве определяли по методам, применяемым для исследования почвенных ферментов: активность каталазы – перманганатометрически, полифенолоксидазы и пероксидазы – йодометрически [345], целлюлазы – с карбоксиметилцеллюлозой, инвертазы – с сахарозой [346], уреазы – по разложению мочевины [347].

Количество выделяющихся редуцирующих сахаров определяли методом Шомоди-Нельсона на спектрофотометре П-5400УФ (Россия) при λ 640 нм [348]. В качестве контроля использовали нейтрализованный ГЛ с минеральными добавками, но без закваски.

Фитотоксичность созревающего компоста определяли по прорастанию семян пшеницы.

Измерение температуры проводили ежедневно, уровень pH, фитотоксичность и ферментативную активность - еженедельно, количество микроорганизмов - раз в две недели, агрохимические исследования - ежемесячно.

Вегетационные опыты проводили в сосудах объемом 0.25 л, количество почвы – 200 г. В каждый сосуд высевали по 5 семян ячменя или пшеницы или 2 семени кукурузы. Эксперимент проводили в 5-кратной повторности. Подсчет результатов осуществляли через две недели для ячменя и пшеницы и через три недели – для кукурузы. По окончании опыта оценивали всхожесть, измеряли длину ростков и корней, массу надземной и подземной частей всех растений. Для обсуждения результатов длину и массу приводили к единому числу растений. Результаты опытов обрабатывали согласно [349].

Для изучения влияния микробных метаболитов на количество почвенных микроорганизмов в 200 г воздушно-сухой почвы (вегетационный сосуд) однократно вносили по 100 мл культуральных фильтратов в разведении 1/100, признанном нами наилучшим по результатам предварительных экспериментов. Для контроля почву обрабатывали таким же количеством соответствующих питательных сред в том же разведении. В течение опыта почву сохраняли увлажненной. Анализ проводили в течение трех месяцев после внесения растворов. Для учета численности микроорганизмов и ферментативной активности применяли методики [45, 346, 347].

Из ГЛ (контрольный опыт по компостированию) нами выделено 46 изолятов микроорганизмов, среди которых были идентифицированы *Penicillium cyclopium* Westling (2 штамма) и *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfelt et Nirenberg (6 штаммов). Культивирование грибов осуществляли в колбах Эрленмейера вместимостью 300 мл при 26 ºС. В колбы наливали по 100 мл жидкой среды состава (г/л): K_2HPO_4 – 1.5, $MgSO_4$ - 0.21, NaCl – 0.1, KNO_3 – 0.5, $FeSO_4$ - 0.001, $CaCO_3$ – 0.25, глюкоза – 10.0. Засев производили агаризованным блоком мицелия диаметром 0.5 см. В культуральных фильтратах определяли лакказную активность по сирингалдазину [350], лигниназную – по вератровому спирту [351], Mn-пероксидазную – по НАДН [352], пероксидазную - по *о*-дианизидину [353], целлюлазную - по фильтровальной бумаге [348]. Количество белка определяли методом Лоури. Измерения проводили на спектрофотометре П-5400УФ (Россия). За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для образования одного мкмоль продукта в 1 мин на 1 мг белка.

В качестве модельных соединений для изучения биотрансформации грибами использовали отечественные препараты: ванилин, ванилиновый спирт, пирокатехин, сиреневую кислоту марки х.ч.; гваяцилпропанол-1, вератровый спирт, синтезированные в отделе химии древесины ИрИХ СО РАН. Чистоту синтезированных реактивов проверяли хроматографически. Исследование проводили при начальной концентрации модельного соединения 0.04-0.08 мг/мл. Пробы в количестве 1 мл отбирали с первого по 24 день культивирования с интервалом 2 сут. Состав метаболитов анализировали методом ВЭЖХ на хроматографе Милихром-1 (Россия) на колонке, заполненной сорбентом Сепарон $C_{18.}$ В качестве элюента использовали 40 %-ный раствор метанола в 0.01М KH_2PO_4, подкисленном H_3PO_4 до pH 3.9. Детектирование осуществляли при λ 280 нм. Метаболиты идентифицировали сравнением их времен удерживания и спектральных отношений A_{260}/A_{230} с аналогичными показателями для стандартных образцов, а также методом добавления стандартного образца в исследуемую

пробу. Содержание соединений в пробах рассчитывали по площади хроматографических пиков в сравнении с площадями пиков образцов известной концентрации.

Агрохимический анализ образцов проводили в соответствии с гостированными методиками для органических удобрений: pH определяли по ГОСТ 26423-85 [354], содержание валового азота - по ГОСТ 26715-85 [355], P_2O_5 – по ГОСТ 26717-85 [356], K_2O – по ГОСТ 26718-85 [357], содержание подвижных форм P_2O_5 – по ГОСТ 27894.5-88 [358], аммонийного азота – по ГОСТ 27894.3-88 [359], нитратный азот - по реакции с дифениламином в модификации Рима [360]. Гуминовые кислоты определяли по ГОСТ 9517-76 [361], сумму поглощенных оснований – по ГОСТ 27821-88 [362], емкость катионного обмена – по ГОСТ 17.4.4.01-84 [363], гидролитическую кислотность – по ГОСТ 26212-91 [364].

Полевые мелкоделяночные опыты проводили в 1999-2001 гг. на светло-серых лесных почвах учебно-производственного участка Иркутской государственной сельскохозяйственной академии (п. Молодежный). По гранулометрическому составу почвы тяжелосуглинистые, характеризуются кислой реакцией пахотного горизонта (pH_{KCl} 4.6). Содержание гумуса (2.4 %) и валового азота (0.1 %) низкое. Содержание обменного калия в пахотном горизонте составляет 18 мг/100 г почвы, подвижного фосфора – 40 мг/100 г почвы.

В работе использовали семена ячменя сорта Неван, пшеницы сорта Ангара-86, кукурузы сорта Коллективный 100 СВ, картофеля сорта Невский. Компост (под кукурузу – 30 и 60 т/га, под картофель – 10 и 20 т/га, под пшеницу и ячмень - 10 т/га) вносили вручную под весеннюю перекопку. Для сравнения испытывали минеральные удобрения в дозе $N_{90}P_{60}K_{60}$, а в опытах с кукурузой – дополнительно перегной в тех же дозах, что и компост. При составлении минеральной удобрительной смеси за основу брали нитроаммофоску. Недостающее количество азота восполняли за счет

азотнокислого аммония. В полевых опытах использовали компост сроком компостирования 3 месяца и 1 год.

Учетная площадь делянки под пшеницу и ячмень – 2 м^2, под кукурузу – 21 м^2, под картофель – 10 м^2. Повторность опыта – четырехкратная. Для обсуждения использовали средние значения результатов за два года. Перед внесением удобрений и после уборки урожая с каждой делянки отбирали смешанный образец почвы тростевым буром. В почве определяли содержание фосфора, калия [365], нитратного азота [366], гумуса [367], кислотность [368]. Результаты опытов обрабатывали методом дисперсионного анализа [349]. В урожае кукурузы контролировали содержание питательных веществ: азота [369], фосфора [370], калия [371], картофеля – сахаров, крахмала [372] и магния [373], а также нитратов [374].Содержание тяжелых металлов и мышьяка определяли в Институте геохимии им. А. П. Виноградова СО РАН (аттестат аккредитации аналитического центра № РОСС RU. 0001.513593 от 16.02.2009 г.) методом атомно-абсорбционной спектроскопии на приборах: PerkinElmer 403 (Cu, Zn) и AAnalist-800 (Pb, Cd, Co, Ni, As); санитарно-гигиеническое заключение получено после испытаний в Центре гигиены и эпидемиологии в Иркутской области (аттестат аккредитации RA.RU. 710079, выдан 30 июля 2015 г.).

2.2 Скрининг микроорганизмов-нефтедеструкторов

Отбор образцов почвы и растений для выделения нефтеокисляющих микроорганизмов проводили на нефтезагрязненной территории Иркутской области (пос. Тыреть).

Для выделения бактерий из эндосферы проводили поверхностную стерилизацию растения обработкой 0.7 %-ным водным раствором гипохлорита натрия в течение 10 мин [375]. Для выделения микроорганизмов из ризосферы растений 10 г корней вместе с почвой помещали в 100 мл стерильной водопроводной воды, встряхивали в течение 15 мин и готовили

разведения. Полученные суспензии высевали в накопительную среду состава (г/л): KNO_3 - 4.0, KH_2PO_4 - 0.6, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ - 1.4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0.8, вода водопроводная до 1 л, pH 7.0, в которую в качестве единственного источника углерода добавляли *н*-гексан, моторное масло, отработанное моторное масло или бензин. Микроорганизмы инкубировали 30 сут. при постоянном встряхивании на качалке при 26 °С. Для получения чистых культур углеводородокисляющих микроорганизмов использовали агаризованную среду МПА.

Для выявления наиболее активных деструкторов нефти использовали двухсуточные культуры бактерий в концентрации 10^7 КОЕ/мл, которые добавляли в жидкую минеральной среду 8Е следующего состава (г/л): NH_4NO_3 - 1.0; $MgCI_2$ - 0.1; KH_2PO_4 - 3.0; K_2HPO_4 - 7.0; $CaCO_3$ - 1.0; pH 7.0, в которую в качестве единственного источника углерода и энергии вносили 2 % (об.) сырой нефти (АНХК г. Ангарск; элементный состав, %: С - 85.0, Н - 11.76, S - 0.92). Культуры выращивали в темноте при 26 °С. Первичную биодеградацию нефти оценивали по эмульгированию поверхностной пленки, помутнению минеральной среды и газообразованию. После 2-х мес. культивирования определяли убыль нефти гравиметрическим методом [376]. Контролем служила стерильная питательная среда, содержащая 2 % нефти.

Способность бактерий утилизировать нефть при различных ее концентрациях определяли в среде 8Е, содержавшей 5, 10, 15, 20 и 50 % нефти. Инокуляцию проводили из расчета 5 мл посевного материала на 50 мл среды. Бактерии культивировали при 26 °С. Через 2 мес. определяли убыль нефти гравиметрическим методом [376].

Для изучения способности штаммов к деструкции нефти и нефтепродуктов использовали твердую среду 8Е, в которую вносили нефть и нефтепродукты (тетрадекан, дизельное топливо) в концентрациях 1.0; 2.5; 5.0; 7.5; 10.0 % (об.). Культуры высевали на чашки Петри и оставляли на 10 сут. Результаты опытов оценивали по системе «++» – наличие активного роста, «+» - наличие роста и «–» – отсутствие роста.

Для изучения разложения нефти ассоциациями микроорганизмов были проверены следующие ассоциации бактерий: 108+114, 112+114, 108+112, 108+112+114, 90+102+108+109+112+114. Для опытов использовали питательную среду 8Е (50 мл) с добавлением 10 % (об.) нефти и 1 мл суспензии клеток микроорганизмов-деструкторов с титром 10^7 КОЕ/мл. Культивирование проводили при 26 °С, после чего определяли убыль нефти гравиметрическим методом.

Для оценки способности микроорганизмов разлагать нефть при низких положительных температурах ассоциации микроорганизмов (108+114,108+112,108+112+114,112+114) культивировали в среде 8Е, в которую вносили 10 % (об.) нефти. Культивирование проводили в течение 2 мес. при 4 ^{0}С и 10 ^{0}С.

Идентификацию бактерий проводили 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) [377].

Для уточнения видовой принадлежности наиболее активных чистых культур проводили анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Этапы работы:

I. Рассев культуры до изолированной колонии, получение биомассы для выделения ДНК.

II. Выделение ДНК.

Геномную ДНК выделяли с помощью коммерческого набора «Bacteria DNA Preparation Kit» (Jena Biosciences).

III. ПЦР-амплификация нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК.

Для амплификации гена 16S рРНК использовали универсальные эубактериальные праймеры 8f (5′-agagtttgatcctggctcag-3′) и 1492r (5′-

ggttaccttgttacgactt-3′) производства «Праймтех» (Беларусь) и реагенты фирмы «Thermo Scientific».

Реакционная смесь содержала: 10 нг ДНК матрицы, 1×буфер для DreamTaq-полимеразы, 2,0 мМ $MgCl_2$, по 2,0 мМ каждого дНТФ, по 10 пМ каждого праймера, 2,5 ед. DreamTaq-полимеразы.

Температурно-временной профиль амплификации: 1 цикл – 5 мин при 95 ºС; 30 циклов – 94 ºС – 20 с, 55 ºС – 20 с, 72 ºС – 90 с; 1 цикл – 3 мин при 72 ºС; охлаждение до 4 ºС.

IV. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР-амплификации

Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1 %-ном агарозном геле с использованием 1×ТАЕ-буфера, напряженность электрического поля – 5 В/см. Визуализация ДНК – окрашивание раствором бромистого этидия (0.05 мкг/мл). Стандарт для определения размера продуктов ПЦР – маркер молекулярной массы ДНК GeneRuler DNA Ladder 1Kb Plus (Thermo Scientific).

V. Очистка продукта ПЦР

Для очистки целевого продукта ПЦР использовали коммерческий набор DNA Extraction kit (Thermo Scientific).

VI. Секвенирование гена 16S рРНК, сравнение анализ нуклеотидных последовательностей и построение филогенетических деревьев

Реакцию секвенирования проводили, используя набор реагентов DNA Cycle Sequencing Kit (Jena Bioscience), согласно прилагаемой инструкции.

Разделение и анализ продуктов секвенирования осуществляли с помощью анализатора Li-COR 4300 DNA Analyzer (США). Компьютерную обработку результатов секвенирования, их редактирование и предоставление в форматах FASTA, Genbank, Plain text выполняли с помощью программы e-Seq™ Software.

Сравнительный анализ гомологии секвенированной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и референтных последовательностей проводили on-line с использованием базы данных GenBank и программы

BLAST [378], а также базы данных и программного обеспечения RDP 10 [379].

Для проведения филогенетического анализа и построения филогенетических деревьев применяли программы ClustalW и Mega5.0.

Для изучения комплексного взаимодействия растения и эндо- и ризосферных микроорганизмов в условиях нефтезагрязнения были использованы семена редьки масличной *Raphanus sativus convar. oleiferus* (L.) Sazonova & Stank. (селекционный образец СИФИБР СО РАН «Линия ИрГСХА»). Семена предварительно стерилизовали, сначала 96 %-ным этанолом в течение 1 мин, а затем 3 %-ной перекисью водорода в течение 20 мин, тщательно промывали и замачивали на 24 ч в суспензии бактерий в концентрации 10^7 КОЕ/мл. В качестве контроля служили растения, семена которых были замочены в стерильной водопроводной воде. Затем семена высевали в контейнеры с увлажненным стерильным песком (60 % от полной влагоемкости) с добавлением 2 % (масс.) нефти. Растения выращивали в течение 14 сут. в контролируемых условиях: температура 20 ^{0}C, освещение 2.1 клк с фотопериодом 14/10 ч (день/ночь). Затем анализировали всхожесть, массу и длину надземной части растения и корней.

В модельном эксперименте по определению степени деградации нефти и почвенного ответа микроорганизмами использовали лесную почву, загрязненную 10 % (об.) нефти.

В контейнеры помещали по 200 г почвы, затем искусственно загрязняли ее сырой нефтью. Почву инокулировали суспензией микроорганизмов-деструкторов с титром 10^7 КОЕ/мл и стерильно перемешивали. Перед внесением консорциума культуры микроорганизмов смешивали. Контролем служила загрязненная почва без внесения микроорганизмов. Инкубирование почвы проводили в течение 60 сут. при 25 ^{0}C, освещении 2.1 клк с фотопериодом 14/10 ч (день/ночь).

Отбор проб для определения фитотоксичности проводили через 1 неделю после начала эксперимента, затем через каждые 2 нед., рыхление и

увлажнение почвы - один раз в неделю, дыхание почвы - каждую неделю. Численность микроорганизмов определяли до загрязнения, затем через 5 сут. и через 2 мес. эксперимента; активность почвенных ферментов (каталаза, пероксидаза, полифенолоксидаза) - через 5 сут. после загрязнения и через 2 мес. эксперимента. Остаточное содержание нефти в почве анализировали через 2 мес. культивирования гравиметрическим методом [376].

Влажность почвы определяли методом высушивания при 105 °С до постоянной массы и рассчитывали по формуле:

$W = ((m - m_1) \cdot 100) / m$,

где m – масса почвы до высушивания; m_1 – масса абсолютно сухой почвы [380].

Методика определения эмиссии CO_2 почвой основана на измерении количества CO_2, выделившегося из почвы за определенный промежуток времени. В контейнер с почвой погружали чашку с 5 мл 0.1Н раствора КОН, контейнер герметично закрывали и выдерживали 24 ч. Затем проводили титрование щелочи 0.1Н раствором H_2SO_4 с 1 %-ным спиртовым раствором фенолфталеина в качестве индикатора. Интенсивность выделения CO_2 почвой определяли по формуле:

$$D = \frac{(a-b) \cdot 8.8}{S \cdot t}$$

D – количество CO_2, выделившегося из почвы, мг/дм^2/ч

a - количество 0.1Н H_2SO_4, пошедшее на титрование щелочи в контроле, мл;

b – количество 0.1Н H_2SO_4, затраченное на титрование щелочи в опыте, мл;

S – площадь изолируемой поверхности, дм^2;

t – время экспозиции;

8.8 – количество CO_2, поглощаемое 1 мл 0.1Н раствора щелочи, мг. Интенсивность эмиссии CO_2 из почвы определяют как количество CO_2 (мг), выделившегося с 1 дм^2 почвы за 24 ч [381].

Для оценки фитотоксичности модельной почвы по 30 г образцов помещали в чашки Петри диаметром 10 см, увлажняли до 60 % от полной влагоемкости почвы и производили посев семян растений: по 50 - в случае редиса (сорт Дуро краснодарское), 30 - пшеницы и 20 - гороха (сорт Сахарный стручок). Учет количества взошедших семян проводили на 1-й, 3-й, 7-й день. Всхожесть семян рассчитывали как процент по отношению к контролю.

Фотосинтетические пигменты экстрагировали из свежего растительного материала 100 %-ным цетоном. Содержание пигментов в ацетоновой вытяжке определяли спектрофотометрически на приборе П-5400УФ (Россия) при длинах волн 662 и 644 нм (хлорофиллы) и 440.5 нм (каротиноиды). Опыт проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях [382].

Для исследования механизма деградации ароматических компонентов нефти и ее модельных соединений (нафталин, фенантрен, антрацен) использовали жидкую среду 8Е, в которую добавляли 10 % (об.) нефти или 2 % (об.) модельного соединения в качестве единственного источника углерода и энергии. Отбор проб проводили через 3, 6, 9 сут. для модельных соединений и еженедельно в течение восьми недель - для нефти. Культуральную жидкость объемом 50 мл подкисляли 2Н HCl до pH 3.0 и экстрагировали этилацетатом в соотношении 1:1 (V:V) [383]. Растворитель удаляли в токе холодного воздуха, а остаток растворяли в 0.2 мл метанола. Контролем служила стерильная минеральная среда. Состав смеси определяли методом ВЭЖХ.

ВЭЖХ-анализ фенольных соединений (ФС) проводили на жидкостном микроколоночном хроматографе «Милихром А-02» («ЭкоНова», Россия) колонке (2×75 мм, 5 μм) ProntoSil 120-5-C18 («ЭкоНова», Россия) в обращенной фазе. Разделение осуществляли при 40 °С, скорости потока 100 мкл/мин в градиенте концентрации А:Б, где А - 0.2Н перхлорат Li в 0.1 %-ном водном растворе трифторуксусной кислоты и Б – 100 %-ный

ацетонитрил (сорт «0»). Градиент изменяли от 5 до 28 % ацетонитрила (Б) в течение 1-9 мин, а от 46 до 100 % ацетонитрила (Б) - 9-18 мин. Объем пробы - 4 μл, детектирование осуществляли при 250, 280, 290, 300 и 310 нм. Идентификацию ФС в смеси проводили по времени удерживания стандартных аутентичных образцов (метчиков), с последующим УФ-детектированием. Для установления природы мажорных компонентов разделение проводили в градиенте ацетонитрила от 5 до 100 %. Для предварительной идентификации ФС использовали библиотеку спектров «БД-2003-500» для «Милихром А-02».

ВЭЖХ-анализ модельных соединений нефти (нафталин, фенантрен, антрацен) проводили с помощью хроматографической системы Agilent 1260 на колонке Zorbax SB-C18 5 μm, 4.6 x 250 mm, с предколонкой Zorbax SB-C18 5 μm, 4.6 x 12.5 mm. Термостатирование колонки при 25 ºС. УФ-детектирование осуществляли при длине волны 280 нм. Элюент - ацетонитрил / 2%-ная уксусная кислота (25/75), скорость подачи 1.3 мл/мин, объем петли 20 μL.

В качестве метчиков вносили аутентичные коммерческие образцы: протокатеховую, ванилиновую, и коричную кислоты («Serva», США); бензойную («Реахим», Украина); *п*-кумаровую, *п*-оксибензойную, *о*-пирокатеховую, салициловую, сиреневую, феруловую, кофейную, пирокатеховую и гидрокоричную кислоты («Реахим», Россия); гентизиновую кислоту («Sigma-Aldrich», США); ванилин («Merck», Германия), *о*-крезол («Acros», Германия), коричный спирт («WOSMRI», Китай) и коричный альдегид («ZJP&Chemical CO, Ltd», Китай).

2.3 Синтез микроорганизмами биологически активных веществ

В экспериментах по изучению синтеза биологически активных веществ использовали только культуральные фильтраты исследуемых микроорганизмов.

Ауксиноподобную активность штаммов определяли в культуральных фильтратах микроорганизмов, выращенных на соответствующих жидких питательных средах [341-343] с добавлением *D,L*-триптофана - 0.2 г/л. Количество ауксинов определяли по методу Сальковского в модификации Гордона и Вебера [384], а их биологическую активность – с помощью двух биотестов: по подавлению прорастания семян горчицы сарепской и по интенсивности укоренения черенков фасоли [385].

Экстракцию культуральных фильтратов проводили трехкратно равными объемами диэтилового эфира. Индивидуальные компоненты (ауксины) в экстрактах определяли методом ТСХ на пластинах «Силуфол» в системе изопропанол - аммиак - вода (10:1:1), проявителем служил реактив Сальковского [386]. В качестве метчиков использовали 0.01 %-ные эфирные растворы γ-3-индолилуксусной (гетероауксин) и γ-(3-индолил)-масляной кислот.

Гиббереллиноподобную активность (ГПА) определяли по удлинению гипокотилей салата Лолла Росса и по эндоспермальному тесту на беззародышевых половинках семян ячменя Неван [385]. Контролем служила соответствующая стерильная питательная среда. Для построения калибровочного графика использовали коммерческие натриевые соли гиббереллиновых кислот в соответствующих концентрациях.

Предпосевную обработку семян пшеницы сорта Ангара-86 и ячменя сорта Неван культуральными фильтратами осуществляли в течение суток, кукурузы сорта Коллективный 100 СВ – двух сут. в чашках Петри в темноте при 24 °С. Контролем служила дистиллированная вода. Для сравнения использовали коммерческие препараты фитогормонов в концентрациях: гетероауксин – 0.001 г/л, натриевые соли гиббереллиновых кислот – 0.01 г/л.

Образование микроорганизмами биосурфактантов определяли косвенными методами: по снижению поверхностного натяжения, показателю гидрофобности и эмульгирующей активности культур. Использовали среду

8E [387] с добавлением 2 % (об.) сырой нефти и микроорганизмов в концентрации 10^7 КОЕ/мл.

Эмульгирующую активность определяли методом Купера [227]. Способность бактерий к снижению поверхностного натяжения нефти определяли в чашках Петри диаметром 15 см, в которые помещали 20 мл дистиллированной воды, затем вносили 1 мкл сырой нефти. В центр поверхности нефти добавляли 100 мкл супернатанта культуры микроорганизма и через 30 с измеряли диаметр образовавшейся чистой зоны [388].

Показатель гидрофобности бактериальных клеток определяли по методу, описанному в работе [389].

Для накопления биосурфактантов микроорганизмы культивировали на среде 8E с использованием 2 % гексадекана в виде единственного источника углерода и энергии на качалке в темноте при 22 ^{o}C. После 6 сут. культивирования проводили экстракцию биосурфактантов из супернатанта смесью хлороформ/метанол в соотношении 3:1 (V/V), предварительно подкислив каждую из проб соляной кислотой до pH 2.

Для определения клеточно-связанных сурфактантов биомассу клеток ресуспензировали в фосфатном буфере (0.1M, pH 6.75). К 3 мл суспензии добавляли 0.5 мл гексадекана, встряхивали в течение 3 мин и оставляли на 10 мин при 37 ^{o}C. Затем отбирали нижний водный слой и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре П-5400УФ при длине волны 585 нм в кювете шириной 1 см. Содержание клеточно-связанных сурфактантов определяли по формуле:

$$Н (\%) = 1-(ОП_1/ОП_0) \times 100 \%,$$

где Н – количество клеточно-связанных сурфактантов, %, $ОП_0$ - оптическая плотность исходной бактериальной суспензии, $ОП_1$- оптическая плотность после встряхивания с гексадеканом.

Для определения химического состава биосурфактантов был проведён ряд качественных реакций согласно [390]. Присутствие белка фиксировали

реакцией с нингидрином; наличие углеводов – реакцией Троммера; липидов – реакцией Гольдмана; крахмала – крахмало-йодной реакцией. Пептидные связи обнаруживали с помощью биуретовой реакции [390].

Тонкослойную хроматографию выполняли на пластинах «Силуфол» в системе хлороформ:метанол:вода (65:15:2). Проявитель - нафтольный реагент (0.5 г α-нафтола в 100 мл смеси метанол:вода (1:1) с последующей обработкой 10 %-ной серной кислотой при нагревании до максимального проявления окраски.

ИК спектры соединений в тонком слое получены на спектрометре FT IR Varian 3100.

Для определения аминокислотного состава культуральные фильтраты лиофилизировали, остаток растворяли в 0.3 М Li-цитратном буфере pH 2.2. Анализ проводили на автоматическом анализаторе аминокислот AAA 339 (Чехия) в Li^+ цикле. Концентрацию аминокислот пересчитывали на исходный культуральный фильтрат.

Антимикробная активность изучалась стандартным диск-диффузионным методом [391] по отношению к микроорганизмам различных таксономических групп: *Bacillus subtilis* B-407, *Enterococcus durans* B-603, *Escherichia coli* B-1238, *Pseudomonas aeruginosa* РПО1 (предоставлены ВКМ). Культуры выращивались: *Bacillus subtilis* – на картофельном агаре, *Enterococcus durans* – на модифицированной среде для молочнокислых бактерий с Твин-80 (среда № 75 ВКМ), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* – на мясо-пептонном агаре. Результаты оценивали по появлению зон угнетения роста микроорганизма. Антагонистическую активность по отношению к *Fusarium orthoceras App. et Wr. var. alibido-biobacillum* (Украинский НИИ ПП) оценивали путем совместного выращивания грибов на твердой среде Сабуро [45].

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

Субстраты, используемые для микробной переработки (нефть и лигноцеллюлозные отходы), обладают рядом общих свойств: все они имеют в своем составе конденсированные ароматические соединения, токсичные для почвы и воды, могут подвергаться биологическому разложению, протекающему в течение длительного периода времени, продукты их деструкции более токсичные, чем исходные субстраты, до настоящего времени нет универсального способа их утилизации. С другой стороны, использование для их переработки одинаковых микроорганизмов неэффективно, т. к. ферментативные процессы, происходящие при деструкции этих субстратов, достаточно сильно различаются, что требует активации различных ферментных систем. Тем не менее, подходы к скринингу культур достаточно близки.

В работе было использовано три различных варианта: выращивание микроорганизмов на питательной среде с субстратом в виде единственного источника углерода и энергии, рост собственно на субстрате или использование для скрининга модельных соединений. Выбор методик связан с особенностями субстратов, сложностью их химического строения и необходимостью оценивать ферментативную активность исследуемых микроорганизмов. Источником микроорганизмов служили либо субстрат, либо музей ИрИХ СО РАН.

3.1 Скрининг культур для трансформации опилок

Экологически и экономически выгодным является использование опилок в качестве субстрата для получения органических удобрений. Этот подход имеет свои положительные и отрицательные моменты. С одной стороны, опилки дают хороший мульчирующий эффект. С другой стороны,

лигноцеллюлозное сырье обладает значительной способностью к физическому и химическому поглощению минеральных веществ благодаря наличию функциональных групп и большой поверхностной активности частиц. Отрицательное влияние лигноцеллюлозных отходов также может быть вызвано наличием или быстрым высвобождением в процессе почвенной микробной деградации биологически активных веществ. Прежде всего, это низкомолекулярные фенольные соединения. Следовательно, для использования опилок в виде удобрения необходима их трансформация.

Для скрининга использовался 21 штамм высших грибов, относящихся к разным классам и составляющих коллекцию дереворазрушающих грибов ИрИХ СО РАН. В качестве основных критериев выбора культур для дальнейшей работы были скорость роста на стерильных увлажненных опилках и изменение их внешнего вида (почернение древесных остатков и изменение их текстуры) (таблица 3.1.1). В результате эксперимента отобраны 7 культур: *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 и 1 MR-1, *Sporotrichum pulverulentum* 1766 и 1767, *Fomitopsis officinalis* и *Acremonium* sp. Для создания эффективной ассоциации проведены тесты на их совместимость (таблица 3.1.2). Рост *Fomitopsis officinalis* угнетался всеми культурами, что позволило исключить его из дальнейших опытов [392].

Таблица 3.1.1 - Результаты скрининга дереворазрушающих грибов

№	Наименование культуры	Степень обрастания опилок в баллах	Скорость модификации опилок в баллах
1.	*Botrytis cinerea*	4	3
2.	*Trametes versicolor*	4	6
3.	*Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725	4	6
4.	*P. chrysosporium* 1 MR-1	4	6
5.	*Penicillium ardosianum* BKMF-1749	3	2
6.	*P. farinosum* BKMF-1746	3	2
7.	*P. citreo-viride* BKMF-1777	3	1
8.	*P. citreo-viride* 49	3	2
9.	*P. funiculosum* BKMF-1115	2	1
10.	*Sporotrichum pulverulentum* 1766	4	6
11.	*S. pulverulentum* 1767	4	6
12.	*Serpula minor* 014	1	2
13.	*Fomitopsis pinicola* 0140	1	2
14.	*F. officinalis* 1126	1	1
15.	*F. pinicola* H-23	1	1
16.	*Laetiporus sulphureus* 0796	2	3
17.	*L. sulphureus* 0189	2	2
18.	*Acremonium* sp.	4	5
19.	*Trichoderma lignorum* 81-17	3	1
20.	*Trichosporon cutaneum* Д-46	4	0
21.	*T. cutaneum* 5	4	0

Таблица 3.1.2 - Совместимость грибных культур

	Trametes versicolor	*Sporotrichum pulverulentum* 1766	*S. pulverulentum* 1767	*Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725	*P. chryso-sporium* 1 MR-1	*Acremoni um* sp.	*Fomitopsis officinalis*
Trametes versicolor	+	+	+	+	+	+	-
Sporotrichum pulverulentum 1766	+	+	+	+	+	+	-
S. pulverulentum 1767	+	+	+	+	+	+	-
Phanerochaete chrysosporium ATCC 24725	+	+	+	+	+	+	-
P. chrysosporium 1 MR-1	+	+	+	+	+	+	+
Acremonium sp.	+	+	+	+	+	+	-
Fomitopsis officinalis	-	-	-	-	+	-	+

«+» - совместимость хорошая; «-» - совместимость плохая, ингибирование

Исходя из совместимости микророганизмов были составлены 4 различных варианта компостной ассоциации (закваски).

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**.**

На основании результатов скорости роста микроорганизмов на стерильных опилках и в соответствии с их внешним видом, модельное компостирование проводилось в течение 3 месяцев в термостатируемых условиях с искусственным поддержанием влажности на уровне 60-70 %. Критериями качества лабораторного компоста служили убыль лигнина и целлюлозы компостной массы, индекс ксилолиза, фитотоксичность, соотношение C/N готового компоста.

Лабораторное компостирование, конечно, не может полноценно ответить на вопрос, как будет осуществляться реальный процесс, но позволяет предварительно оценить способность ассоциации к разложению древесных опилок. Оказалось, что все исследуемые варианты обладают высокой дереворазрушающей активностью (таблица 3.1.3). Исключение составлял вариант 4, убыль лигнина в котором была ниже 20 %. Этот вариант, в отличие от всех остальных, проявлял фитотоксичность. Интересно, что в этом варианте были собраны все культуры, проявившие активность при скрининге. Вероятно, большое количество различных микроорганизмов приводит к избыточному пулу внеклеточных биологически активных соединений и ферментов, что негативно сказывается на результате. По совокупности результатов оптимальным был признан вариант 3 [288].

Таблица 3.1.3 - Результаты компостирования опилок различными вариантами заквасок

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 %

Таким образом, в результате первичного скрининга и модельного эксперимента была создана ассоциация дереворазрушающих грибов, состоящая из *Trametes versicolor*, *Sporotrichum pulverulentum* 1767, *Acremonium* sp., *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, *P. chrysosporium* 1 MR-1 и способная не только сосуществовать на лигноцеллюлозном субстрате, но и активно его метаболизировать.

3.2 Скрининг пионерных микроорганизмов, колонизирующих свежий гидролизный лигнин

Гидролизный лигнин - весьма специфический субстрат для микробной переработки. Его pH составляет около 2.0-2.5 из-за присутствия остаточных количеств разбавленной серной кислоты, которой осуществляется гидролиз древесины. Наличие в нем небольшого количества моносахаров облегчает рост микроорганизмов, но лимитирующим остается практически полное отсутствие азота. Таким образом, свежий ГЛ стерилен [393], а колонизировать его в короткие сроки способно лишь ограниченное число видов микроорганизмов.

Из нейтрализованного ГЛ после двух недель эксперимента без внесения «закваски» было выделено 46 штаммов микроорганизмов. Это штаммы грибов - сапротрофов, в природных условиях способных колонизировать практически любой органический субстрат и использовать его компоненты в виде источника питания. К пионерным микроорганизмам, заселяющим древесные субстраты, относятся быстрорастущие несовершенные и сумчатые грибы. Несмотря на то, что обычно они питаются легкодоступными веществами субстрата, их считают способными довести процесс деструкции до конца [394], и, следовательно, они могут оказаться перспективными при компостировании. При этом они должны иметь хорошо развитый ферментативный аппарат, включающий ферменты как целлюлазного, так и оксидоредуктазного типов. По скорости роста на минеральной питательной среде с ГЛ в виде единственного источника углерода были выбраны 8 штаммов микроорганизмов, отнесенных к двум видам: *Penicillium cyclopium* (2 штамма) и *Trichoderma asperellum* (6 штаммов).

Следующим этапом работы было выяснение способности выделенных штаммов разрушать лигнин. В связи с трудностью анализа, а также для ускорения скрининга исследования проводили на модельных соединениях лигнина методом ВЭЖХ, причем были взяты как соединения со свободной (пирокатехин, ванилиновый спирт, ванилин, гваяцилпропанол-1), так и с замещенной (вератровый спирт) фенольной гидроксильной группой.

Соединения, в которых фенольная гидроксильная группа была свободна, метаболизировались существенно активнее, чем при наличии заместителей. Эти соединения полностью исчезали из культуральных фильтратов на 8-24 сут. в зависимости от штамма. Максимальная скорость модификации модельных соединений наблюдалась на 3-5 сут. культивирования (рисунок 3.2.1**).**

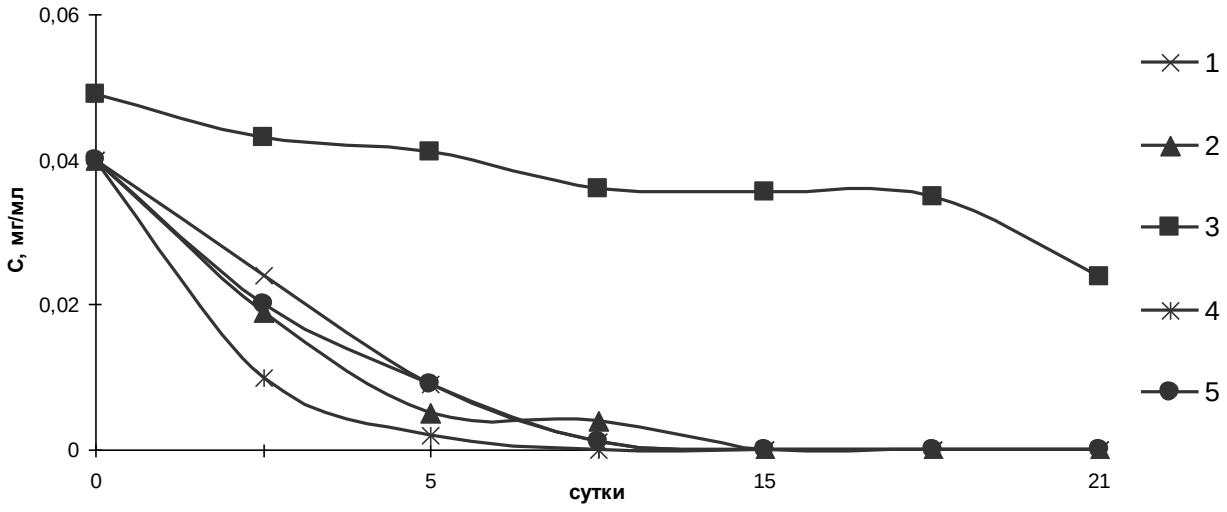
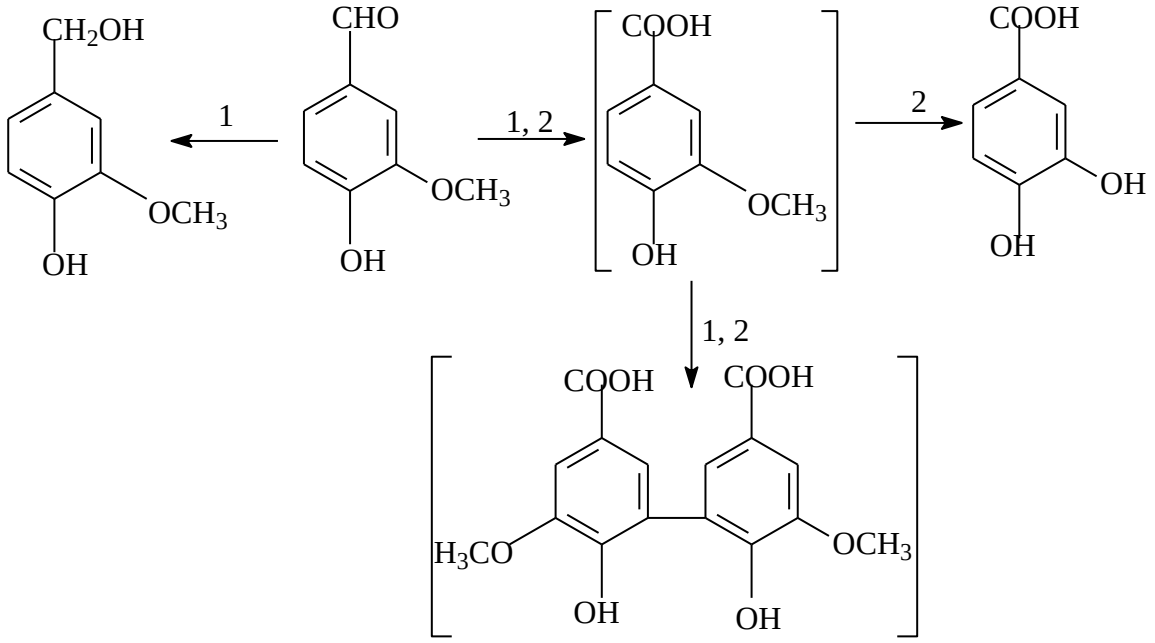


Рисунок 3.2.1 - Содержание в культуральной жидкости *Trichoderma asperellum* 8 соединений: ванилина (1); ванилинового спирта (2); вератрового спирта (3); пирокатехина (4); гваяцилпропонола-1 (5).

Ванилиновый спирт включался в метаболизм большинством культур через олигомеризацию.

Деструкция ванилина происходит либо по пути олигомеризации (димеризации), либо с восстановлением до ванилинового спирта. Оба эти варианта описаны для микробного разложения [66]. Интересно, что путь деградации не зависит от вида микроорганизма. Так, *P. cyclopium* 6, *P. cyclopium* 9, *T. asperellum* 7 подвергают ванилин олигомеризации, тогда как для представителей одного вида *T. asperellum* 3, *T. asperellum* 8, *T. asperellum* 10 и *T. asperellum* 11 существуют различия в путях разложения ванилина. Среди появляющихся в течение культивирования двух основных метаболитов один общий для всех четырех микроорганизмов по совокупности данных (спектральные характеристики, двухволновая детекция A_{260}/A_{230}) предположительно определен как димер ванилиновой кислоты, второй - у штаммов № 3 и 11 детектировался как ванилиновый спирт (таблица 3.2.1), а для штаммов 8 и 10 - протокатеховая кислота. Следовательно, исследованные микроорганизмы способны к окислению ванилина с последующей димеризацией образовавшегося продукта. Однако, несмотря на их принадлежность к одному виду, проявляются штаммовые

различия: одни культуры (№ 3 и 11) осуществляют реакции восстановления, другие (№ 8 и 10) – деметоксилирования:



Пирокатехин, как одно из наиболее легкоразлагаемых фенольных соединений, активно включался в метаболизм всеми культурами и разрушался до алифатических соединений. Единственный детектируемый метаболит у *P. cyclopium* 9 и *T. asperellum* 7 имел максимум поглощения при 250 нм, что характерно для *цис,цис*-муконовой кислоты. А *T. asperellum* 3, *T. asperellum* 8, *T. asperellum* 10 и *T. asperellum* 11 трансформировали пирокатехин с образованием от 5 до 10 различных продуктов фенольной природы (рисунок 3.2.2).

Гваяцилпропанол-1 метаболизировался существенно медленнее. Так, в течение 6-10 сут. он полностью элиминировался из культуральных фильтратов лишь у *T. asperellum* 8, *P. cyclopium* 6 и *P. cyclopium* 9. *T. asperellum* 4, *T. asperellum* 10 и *T. asperellum* 11 были способны его утилизировать только на 19-20 сут. культивирования. При этом в первом случае образовывалась серия метаболитов, а во втором – либо единственное соединение (для *T. asperellum* 11), либо фенольные вещества вообще не образовывались.

Таблица 3.2.1 - Хроматографические характеристики модельных соединений лигнина и их метаболитов

Модельное соединение	Объем удерживания	Спектральное отношение, A_{260}/A_{230}	Максимумы поглощения
Ванилин	456	0.27	234, 280, 310
Ванилиновый спирт	261	0.09	232, 280
Ванилиновая кислота*	428	1.26	224, 262, 296
Димер ванилиновой кислоты	263	1.32	224, 262, 294
Вератровый спирт	361	0.08	236, 280
Вератровый альдегид*	638	0.29	
Вератровая кислота	536	1.07	220, 262, 294
Протокатеховая кислота	205	1.21	212, 260, 296
Гваяцилпропанол-1*	495	0.08	232, 282
Пирокатехин*	291	0.31	278

* - стандартные реактивы (характеристики метаболитов совпадают со стандартом).

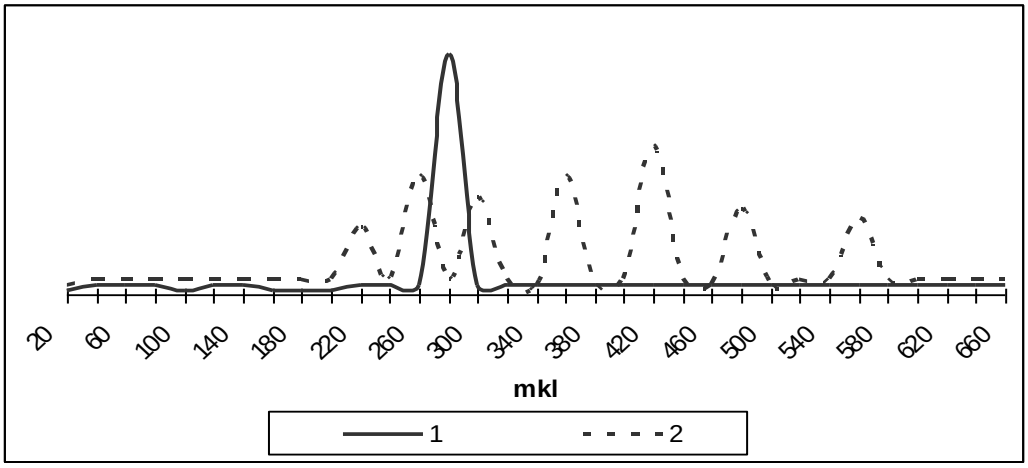
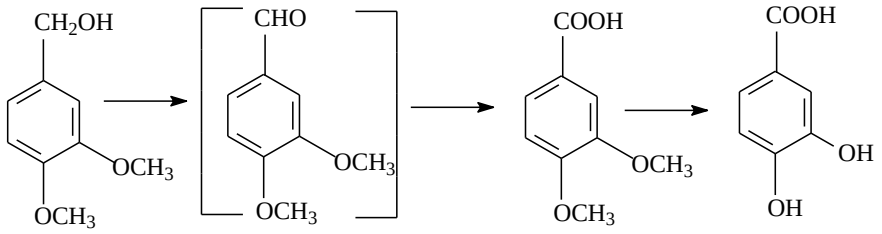


Рисунок 3.2.2 - ВЭЖХ метаболитов пирокатехина, инкубировавшегося с: 1 - *P. cyclopium* 9 и *T. asperellum* 7; 2 - *T. asperellum* 3, *T. asperellum* 8, *T. asperellum* 10 и *T. asperellum* 11.

Интересна динамика разложения вератрового спирта (рисунок 3.2.3). Микроорганизмы, способные его деструктировать (*T. asperellum* 4, *T. asperellum* 7 и *P. cyclopium* 6 не обладают этой способностью), обязательно обнаруживают среди метаболитов вератровую кислоту, которая затем либо накапливается в питательной среде (*T. asperellum* 11), либо постадийно деметоксилируется до протокатеховой:



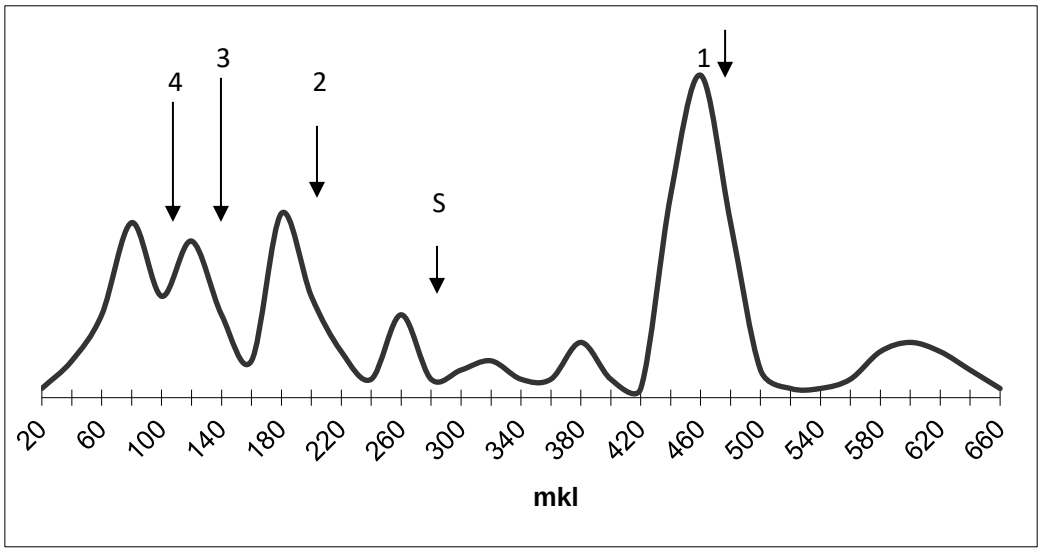


Рисунок 3.2.3 - ВЭЖХ метаболитов вератрового спирта (S), инкубированного с *Trichoderma asperellum* 10 в течение 12 сут.: 1 - вератровая кислота; 2 – ванилин; 3 – ванилиновый спирт; 4 - протокатеховая кислота.

В то же время, существует еще один путь, включающий трансформацию вератрового спирта в ванилиновый спирт с частичным окислением последнего до ванилина. Он реализуется только у *T. asperellum* 10 (рисунок 3.2.4), в разные сроки культивирования которого с вератровым спиртом были обнаружены 6 метаболитов, среди них идентифицированы вератровая и протокатеховая кислоты, ванилиновый спирт и ванилин.

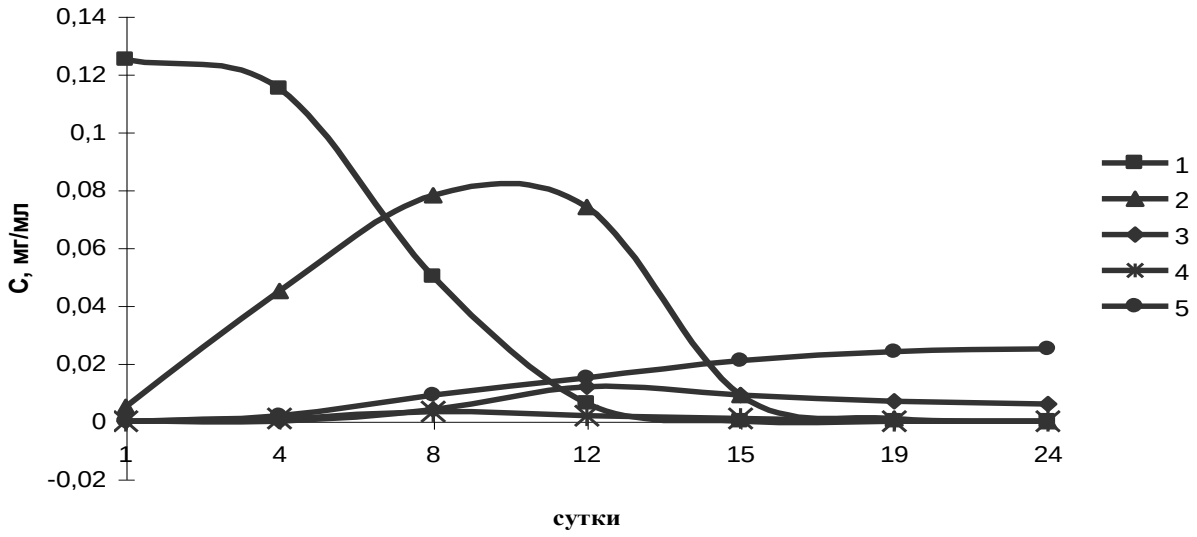


Рисунок 3.2.4 - Содержание в культуральной жидкости *Trichoderma asperellum* 10 субстрата (1) и метаболитов (2-5): 1 – вератровый спирт; 2 – вератровая кислота; 3 – ванилиновый спирт; 4 – ванилин; 5 - протокатеховая кислота.

Сиреневая кислота проявляла резистентность к биотрансформации всеми исследованными штаммами.

В связи с тем, что все исследованные модельные соединения лигнина метаболизируются по пути окисления, логично было предположить наличие у микроорганизмов оксидоредуктазных ферментных систем. Однако, мы выявили наличие только Mn-зависимой пероксидазы. Известно, что Mn–пероксидаза является ключевым ферментом некоторых грибов и играет при этом важную роль в разложении лигнина [395]. Фермент окисляет фенольные единицы лигнина до феноксильных радикалов, которые в свою очередь подвергаются разнообразным реакциям, заканчивающимся деполимеризацией [396]. Отсутствие значимых количеств лакказы, пероксидазы и каталазы можно объяснить тем, что выделенные штаммы не являются специфическими дереворазрушающими грибами, а, скорее, «мусорщиками», способными разлагать промежуточные продукты метаболизма других микроорганизмов. По динамике Mn-пероксидазной активности все штаммы условно можно разделить на две группы. Первая

группа (*T. asperellum* 4, *T. asperellum* 7, *T. asperellum* 10, *T. asperellum* 11, *P. cyclopium* 6, *P. cyclopium* 9) имела два четких максимума активности: на 5-7 и 13-15 сут. культивирования (рисунок 3.2.5). Первый максимум соответствовал началу фазы экспоненциального роста, а второй – фазы споруляции. Вторая группа (*T. asperellum* 3, *T. asperellum* 8) характеризовалась тремя максимумами активности: 8, 13-14, 18 сут. Наибольшей суммарной Mn-пероксидазной активностью обладали *T. asperellum* 8, *T. asperellum* 10 и *T. asperellum* 11 [397].

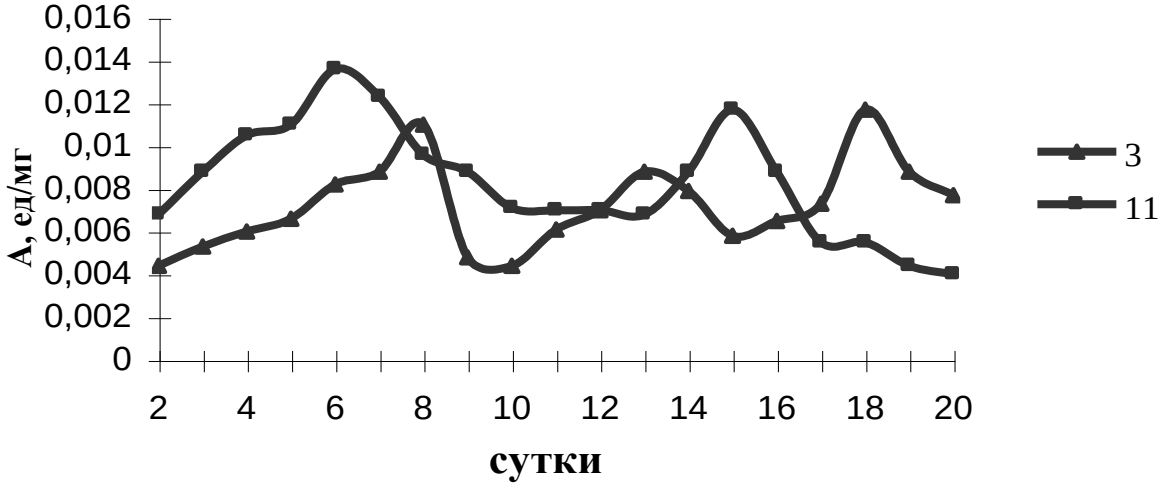


Рисунок 3.2.5 - Динамика Mn-пероксидазной активности *Trichoderma asperellum* 3 и *Trichoderma asperellum* 11.

Анализ динамики Mn-пероксидазной активности и убыли субстратов показал, что активная биотрансформация соединений с незамещенной фенольной гидроксильной группой для всех культур совпадала с первым максимумом активности фермента и началом фазы экспоненциального роста (рисунок 3.2.5). Это может свидетельствовать о том, что данные соединения служат для микроорганизмов в основном пищевыми субстратами, а интермедиаты не являются вторичными метаболитами. Тогда как в случае вератрового спирта для культур первой группы (два максимума активности) активное разрушение субстрата совпадало с максимумами активности фермента, что наиболее четко прослеживалось в случае *P. cyclopium* 9

(рисунок 3.2.6). Исключение составлял гриб *T. asperellum* 11, который активно разрушал вератровый спирт лишь после 13 сут. культивирования.

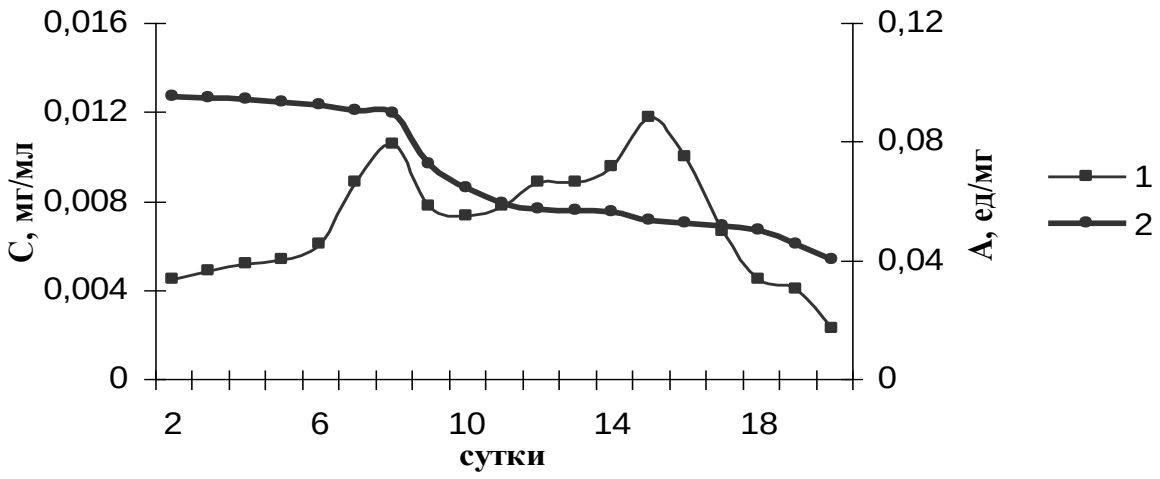


Рисунок 3.2.6. - Изменение активности Mn-зависимой пероксидазы (1) и содержания вератрового спирта (2) в процессе культивирования *Penicillium cyclopium* 9.

Присутствие в ГЛ остатков углеводов, в частности, целлюлозы, позволило предположить наличие у исследованных грибов целлюлазного комплекса. Суммарная активность целлюлаз детектировалась для всех изолятов и имела два максимума (на 6-9 и 14-16 сут.). *P. cyclopium* 6 отличался наиболее высокой целлюлазной активностью (в 5-15 раз выше, чем остальные штаммы) (рисунок 3.2.7). Известно, что микроорганизмы родов *Penicillium* и *Trichoderma*, обладают высокой активностью целлюлаз и гемицеллюлаз, и даже используются как их продуценты [394].

По результатам предварительного скрининга был выбран штамм *T. asperellum* 3, обладающий высокой скоростью утилизации фенольных субстратов и Mn-пероксидазной активностью. Этот микроорганизм был использован для модификации разработанной в ИрИХ СО РАН лигнинразрушающей ассоциации [398].

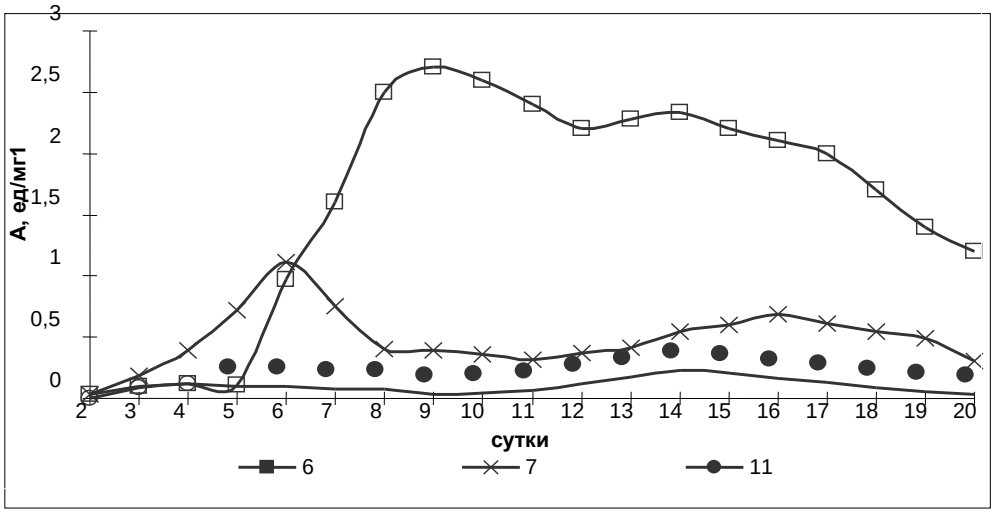


Рисунок 3.2.7 - Изменение целлюлазной активности *Trichoderma asperellum* 7, *Penicillium cyclopium* 6 и *Trichoderma asperellum* 11 в процессе культивирования.

В результате лабораторного компостирования выяснилось, что компост, полученный с помощью модифицированной закваски, характеризуется высоким содержанием гуминовых кислот и пониженным содержанием лигнина в конечном продукте (таблица 3.2.2) при сохранении срока компостирования и отсутствии фитотоксичности.

Таблица 3.2.2 - Результаты компостирования ГЛ различными вариантами заквасок

Вариант	Убыль, %		Содержание гуминовых кислот, %	Фитотоксичность (% проросших семян)[1]
	лигнина	целлюлозы		
1[2]	31.0	27.6	13.8	88
2[3]	38.1	27.8	15.5	90

[1] - количество проросших семян в контроле – 74 %;

[2] - компост, приготовленный с применением ранее разработанной закваски [398];

[3] - компост, приготовленный с применением закваски и *T. asperellum* № 3

Таким образом, предварительный скрининг выявил ряд пионерных микроорганизмов - колонизаторов гидролизного лигнина, способных метаболизировать его модельные соединения и обладающих целлюлазной и Mn-пероксидазной активностью. Динамика последней коррелирует со скоростью деструкции моделей. Показано, что существуют штаммовые различия в деструкции тех или иных соединений. Введение в существующую ассоциацию для компостирования гидролизного лигнина *T. asperellum* 3 позволяет повысить степень гумификации субстрата при минимальной потере органического вещества без изменения срока компостирования.

3.3 Скрининг микроорганизмов для биодеградации нефти

Нефть и нефтепродукты являются наиболее значимыми и опасными загрязнителями окружающей среды во всем мире. Существующие методы очистки нефтезагрязненных территорий приводят к вторичному загрязнению почвы или требуют проведения больших рекультивационных работ и дополнительной очистки [399]. В настоящее время перспективный метод ремедиации – микробиологический [400-402]. В последнее время особое внимание уделяется роли эндофитных и ризосферных бактерий в биоремедиации почвы. Есть сведения, указывающие, что растения, выросшие в условиях нефтезагрязнения, селективно накапливают эндофитную микрофлору, имеющую плазмиды для утилизации нефтепродуктов [403]. Численность микроорганизмов, способных к деструкции загрязнителей, в ризосфере растений существенно больше, чем вне ее [404, 405]. Имеются сведения о применении для разложении нефти грибов [150].

Отбор проб для выделения микроорганизмов проводился на территории пос. Тыреть (Иркутская область), где в 1993 г. произошел крупный пролив нефти. На месте разрыва нефтепровода были отобраны пробы растений, наиболее широко представленные в месте загрязнения (лапчатка, лопух, осока, пырей), а также образцы почвы. Из эндо- и ризосферы исследуемых

растений и почвы было выделено 60 культур микроорганизмов, потенциально обладающих углеводородокисляющими свойствами (таблица 3.3.1) и исследована их способность разлагать сырую нефть в жидкой минеральной среде 8Е. Количественная оценка деструктирующей активности штаммов показала различную степень утилизации нефти (таблица 3.3.2). Для дальнейших исследований были взяты 6 наиболее активных микроорганизмов (разрушение более 40 % нефти в модели).

Таблица 3.3.1 - Характеристика культур бактерий

Номер культуры	Объект выделения
77, 78, 81, 82, 83, 76	Эндосфера пырея (*Elytrigia repens*) (L.nevski)
88, 91, 92, 96, 89, 86, 90	Эндосфера осоки (*Carex acuta*)
64	Эндосфера лапчатки (*Potentilla anserina*)
59, 60	Эндосфера лапчатки(*Potentilla anserina*)
74	Эндосфера лопуха (*Arctium lappa*)
94, 97, 102, 104	Ризосфера осоки (*Carex hancockiana maxim*)
98, 99, 100, 105	Ризосфера осоки (*Carex hancockiana maxim*)
108, 114, 116	Ризосфера пырея (*Elytrigia repens*)
109, 112, 106, 111	Ризосфера пырея (*Elytrigia repens*)
120, 121, 122, 124, 130, 132, 133, 137, 138, 131	почва
129, 139	почва

Таблица 3.3.2 - Биотрансформация нефти в жидкой минеральной среде бактериями, ассоциированными с растениями

	Убыль нефти, % масс.	Бактерии
Слаборазрушающие	5-10	59, 111
	15-20	83, 91, 129, 120, 133, 77, 78, 104, 136, 131, 89, 74, 116, 106, 140, 141, 142
Среднеразрушающие	20-30	98, 99, 100, 121, 124, 130, 132, 82, 11, 139
	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

При визуальном исследовании выяснилось, что культуры 102, 108, 109, 90, разлагают нефть с образованием эмульсии (рисунок 3.3.1).

А Б В Г

Рисунок 3.3.1 - Деградация углеводородов нефти в жидкой минеральной среде: А - контроль - нефть, Б - добавление в среду суспензии штаммов 102, В - 109, Г - 108.

Убыль нефти при культивировании штаммов 112 и 114 составляла 50 и 54 % соответственно. При этом наблюдалось истончение нефтяной пленки, ее обесцвечивание, но эмульгирование нефти не происходило.

Культуральная жидкость становилась мутной за счет увеличения биомассы бактерий, отмечалось выраженное газообразование (рисунок 3.3.2).

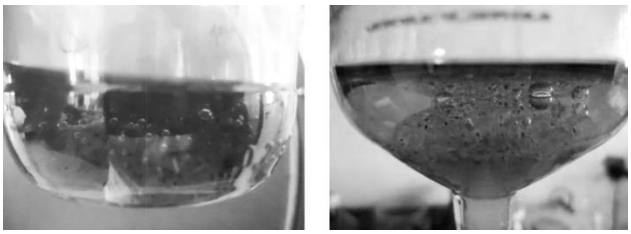


Рисунок 3.3.2 - Образование газов штаммом 112 при разложении сырой нефти

Определение потенциала выбранных культур при деструкции нефтепродуктов на твердой минеральной среде показало активный рост всех исследованных штаммов на модельных соединениях - тетрадекане и дизельном топливе при их различных концентрациях в среде. Особенно активный рост показали три штамма: 108, 112, 114 (таблица 3.3.3).

Таблица 3.3.3 - Рост бактерий на тетрадекане и дизельном топливе

Штамм	Тетрадекан, %					Дизельное топливо, %				
	1	2,5	5	7,5	10	1	2,5	5	7,5	10
112	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
114	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
108	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+
109	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
102	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
90	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

«++» – наличие активного роста, «+» -наличие роста , «–» – отсутствие роста

Дальнейшая оценка отобранных штаммов проводилась по их способности к росту на жидкой минеральной среде, содержащей различные

концентрации сырой нефти. Главной проблемой биоремедиации является то, что микроорганизмы не способны существовать при высоких концентрациях нефти, поэтому этот метод может не подходить для свежих проливов нефти. Установлено, что при увеличении в среде концентрации нефти скорость ее деградации снижалась (таблица 3.3.4). Тем не менее, все штаммы успешно росли при высоком (20 %) и экстремально высоком (50 %) содержании нефти в питательной среде, а штамм 114 смог утилизировать 10 % нефти даже при таком уровне нефтезагрязнения.

Таблица 3.3.4 - Степень утилизации нефти бактериями при разной концентрации субстрата, %

концентрация нефти, %	штамм					
	90	102	108	109	112	114
5	26	22	30	24	35	32
10	15	13	11	12	28	23
15	12	10	10	10	24	22
20	9	7	7	8	16	18
50	5	4	5	6	8	10

Известно, что применение ассоциаций микроорганизмов при биоремедиации почв гораздо эффективнее использования индивидуальных штаммов. Это связано, прежде всего, с разнообразием ферментов, вырабатываемых каждым микроорганизмом, что приводит к более полному разрушению сложных химических структур, составляющих нефть. В связи с этим были проверены различные по видовому составу композиции, составлено 5 различных бактериальных консорциумов. Показано, что все композиции эффективно разлагают нефть (убыль составляет 25-32 %. Наилучшей нефтедеструктирующей активностью обладают совместно культивируемые штаммы 112 и 114, степень деструкции нефти которыми составляла 32 %. (таблица 3.3.5).

Таблица 3.3.5 - Разложение нефти ассоциациями микроорганизмов

Ассоциации штаммов	Степень деструкции нефти, %
108+114	26±1.5
112+114	32±1.0
108+112	30±3.5
108+112+114	25±3.8
90+102+108+109+112+114	28±2.8

Одним из важных факторов, влияющих на способность микроорганизмов к разложению нефти, является температура. Так как Иркутская область относится к регионам, где теплый период непродолжителен, поиск микроорганизмов - деструкторов углеводородов, устойчивых к низким температурам, актуален. Поэтому была проведена оценка деструктивного потенциала штаммов в отношении углеволородов нефти при низких положительных температурах. Установлено, что при температуре близкой к нулю разложение нефти практически не происходит (таблица 3.3.6). В тоже время, при незначительном повышении температуры скорость деструкции увеличивается. Особенно выделяется ассоциация культур 112 и 114, для которых убыль нефти за 2 месяца культивирования составила 15 %. При совместном действии этих микроорганизмов отмечено разрушение нефтяной пленки с образованием мелких капель нефти.

Таблица 3.3.6 - Утилизация нефти микроорганизмами при низких положительных температурах

Температура разложения	Ассоциация культур	Убыль нефти, %
4 ºС	108+114	2.0±1.5
	108+112	1.5±2.0
	108+112+114	1.3±2.1
	112+114	3.4±0.5
10 ºС	108+114	5.0±0.2
	108+112	7.0±0.5
	108+112+114	4.4±0.8
	112+114	**15.0±0.2**

Все наиболее перспективные микроорганизмы были идентифицированы молекулярно-генетическими методами (таблица 3.3.7).

Таблица 3.3.7 - Молекулярно-генетическая идентификация выделенных штаммов

образец	Идентифицированный род	% гомологии
102	*Pseudomonas oryzihabitans*	99
90	*Pseudomonas corrugate*	97
109	*Pseudomonas* sp.	99
112	*Acinetobacter guillouiae*	98
114	*Acinetobacter guillouiae*	99
108	*Rhodococcus erythropolis*	98

Сравнительный анализ секвенированной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма **90** с референтными нуклеотидными последовательностями из международных баз данных

GenBank и RDP10 выявил ее максимальное сходство с нуклеотидной последовательностью гена 16S рРНК представителей рода *Pseudomonas* видов *Pseudomonas antarctica* (97 %), *Pseudomonas fluorescens* (97 %), *Pseudomonas sp*. (97 %). По данным анализа гена 16S рРНК было построено филогенетическое дерево. По результатам филогенетического анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК наиболее вероятной является принадлежность штамма **90** к виду *Pseudomonas corrugate*.

Сравнительный анализ секвенированной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма **102** с референтными нуклеотидными последовательностями из международных баз данных GenBank и RDP 10 выявил ее максимальное сходство с нуклеотидной последовательностью гена 16S рРНК представителей рода *Pseudomonas* вида *Pseudomonas putida* (99 %), *Pseudomonas oryzihabitans* (99 %), *Pseudomonas* sp. (99 %). По результатам филогенетического анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК наиболее вероятной является принадлежность штамма 102 к роду *Pseudomonas* sp.

Сравнительный анализ секвенированной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма **108** с референтными нуклеотидными последовательностями из международных баз данных GenBank и RDP10 выявил ее максимальное сходство с нуклеотидной последовательностью гена 16S рРНК представителей рода *Rhodococcus* вида *Rhodococcus erythropolis* (99 %), *Rhodococcus* sp. (99 %). По результатам филогенетического анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и анализа профиля тотальных клеточных белков методом MALDI TOF MS наиболее вероятной является принадлежность штамма 108 к виду *Rhodococcus erythropolis*.

Сравнительный анализ секвенированной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма **109** с референтными нуклеотидными последовательностями из международных баз данных GenBank и RDP10 выявил ее максимальное сходство с нуклеотидной

последовательностью гена 16S рРНК представителей рода *Pseudomonas* вида *Pseudomonas oryzihabitans* (97 %).

Сравнительный анализ секвенированной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма 112 с референтными нуклеотидными последовательностями из международных баз данных GenBank и RDP10 выявил ее максимальное сходство с нуклеотидной последовательностью гена 16S рРНК представителей рода *Acinetobacter* вида *Acinetobacter guillouiae* (98 %). По результатам филогенетического анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и анализа профиля тотальных клеточных белков методом MALDI TOF MS наиболее вероятной является принадлежность штамма 112 к виду *Acinetobacter guillouiae*.

Сравнительный анализ секвенированной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма 114 с референтными нуклеотидными последовательностями из международных баз данных GenBank и RDP10 выявил ее максимальное сходство с нуклеотидной последовательностью гена 16S рРНК представителей рода *Acinetobacter* вида *Acinetobacter guillouiae* (99 %). По результатам филогенетического анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и анализа профиля тотальных клеточных белков методом MALDI TOF MS наиболее вероятной является принадлежность штамма 114 к виду *Acinetobacter guillouiae*.

Следующим этапом было исследование способности наиболее активных штаммов метаболизировать модельные соединения нефти (нафталин, фенантрен и антрацен). Согласно литературным данным, разложение полифенолов происходит за счет внедрения в молекулу под действием моно- или диоксигеназ одного или двух атомов кислорода и образования одноядерных фенолов, а затем ациклических соединений, способных растворяться в воде [406-408], причем существует два основных метаболических пути разложения этих соединений. Как видно из полученных данных (таблица 3.3.8), деградация нафталина штаммами *R. erythropolis* 108 и

A. guillouiae 112 осуществляется по-разному [409]. Для *R. erythropolis* 108 деградация протекает ступенчато, причем есть 2 пути ее осуществления:

1. С образованием гентизиновой кислоты через 1,2-дигидроксинафталин, салициловый альдегид и салициловую кислоту;

2. С последовательным образованием 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты, 2-карбоксибензальдегида, *о*-фталевой кислоты и образованием протокатеховой кислоты.

Таблица 3.3.8 - Содержание интермедиатов деградации нафталина, мг/мл

		0 сут.	3 сут.	6 сут.
Rhodococcus erythropolis 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
Acinetobacter guillouiae 112	нафталин	319.7	0	0
	протокатеховая кислота	0	136.1	150.2
	фталевая кислота	0	0	0
	гентизиновая кислота	0	0	0

Количество образовавшихся интермедиатов при культивировании *R. erythropolis* 108 с нафталином уменьшается с увеличением продолжительности культивирования [410]. Это свидетельствует о том, что, кроме трансформации нафталина, осуществляется также окисление самих интермедиатов (рисунок 3.3.3). Это подтверждается отсутствием в культуральной среде на 6 сутки фталевой и гентизиновой кислот и снижением содержания протокатеховой кислоты.

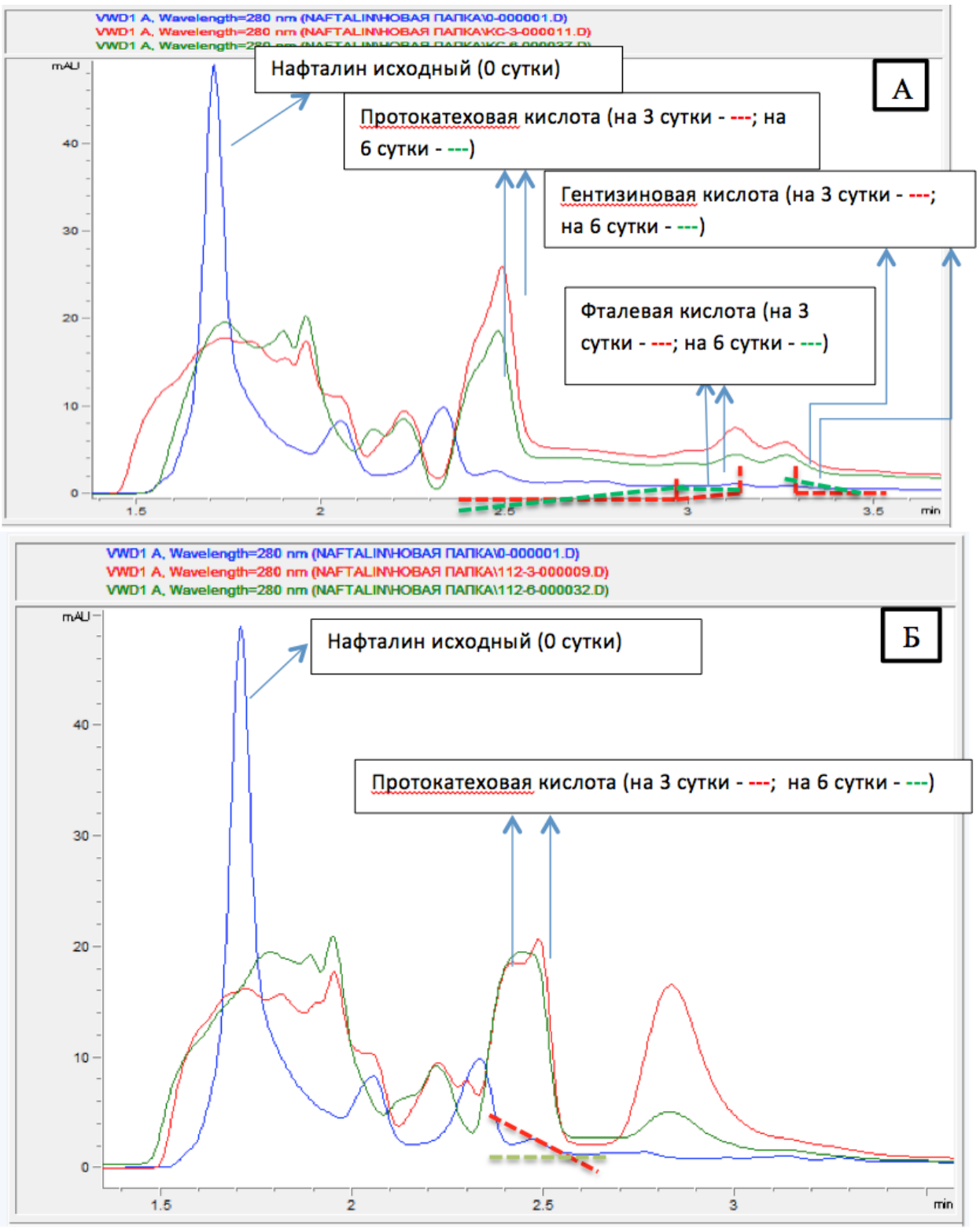


Рисунок 3.3.3 - Деструкция нафталина штаммами: А – *R. erythropolis* 108; Б - *A. guillouiae* 112

A. guillouiae 112 также способен окислять нафталин двумя метаболическими путями. Однако, как показывают данные ВЭЖХ, основное отличие *A. guillouiae* 112 от *R. erythropolis* 108 состоит в том, что он не обладает ферментами для дальнейшего окисления протокатеховой кислоты,

которая накапливается в среде культивирования. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что разложение через протокатеховую кислоту является для *A. guillouiae* 112 факультативным и осуществляется не до конца.

В тоже время на хроматограммах не диагностируются пики салициловой кислоты и пирокатехтна, что свидетельствует об их быстрой трансформации в другие интермедиаты.

Деградация фенантрена также осуществляется по двум метаболическим путям (рисунок 3.3.4, таблица 3.3.9):

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-карбоксибензальдегида [411-413].

Таблица 3.3.9 - Содержание интермедиатов деградации фенантрена, мг/мл

		0 сут.	3 сут.	6 сут.	9 сут.
Rhodococcus erythropolis 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
Acinetobacter guillouiae 112	фенантрен	225.4	60.2	71.3	60.8
	протокатеховая кислота	0	122.7	128.9	302.1
	о-фталевая кислота	0	3.6	4.1	50.9
	гентизиновая кислота	0	2.6	9.6	61.3

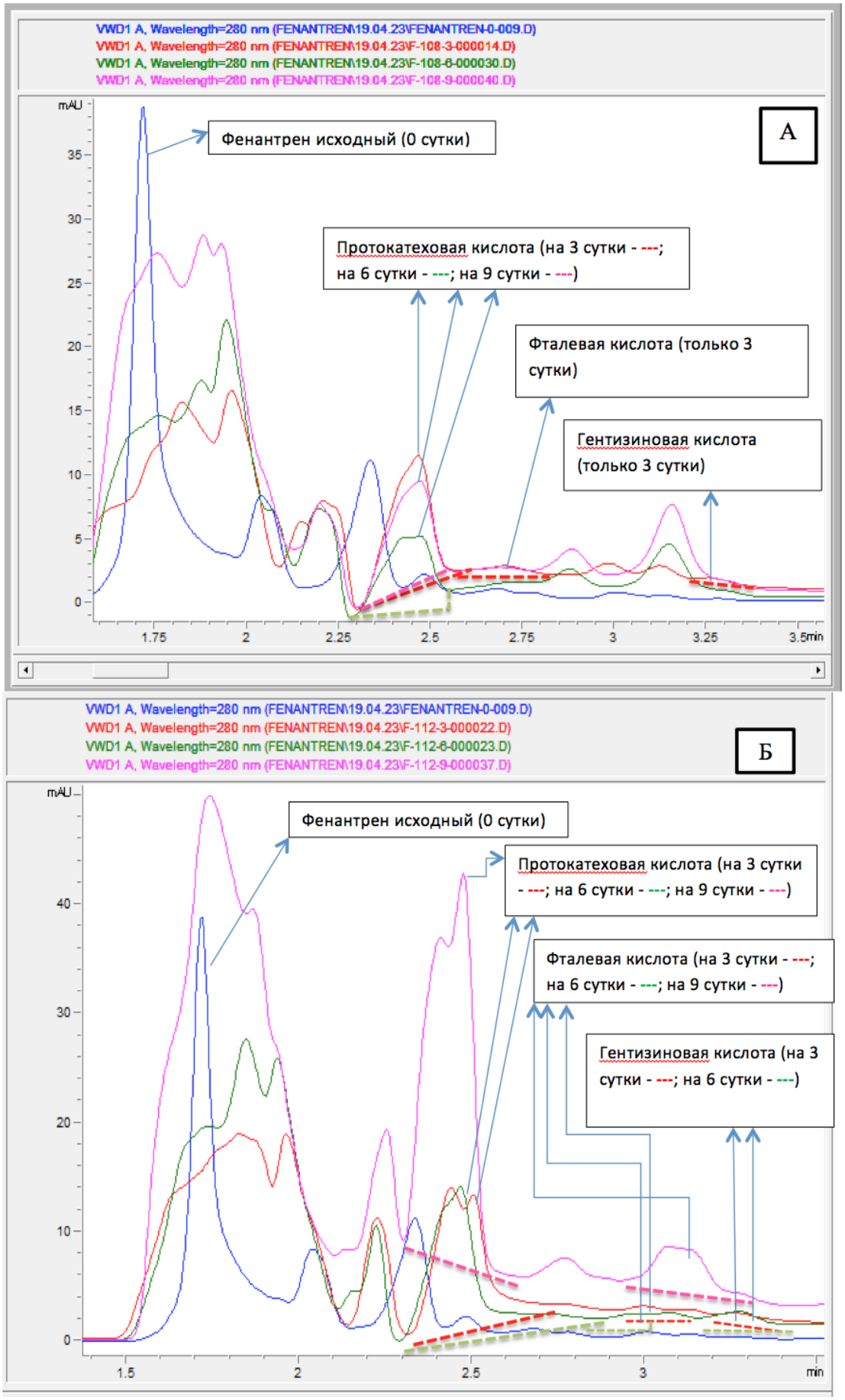


Рисунок 3.3.4 - Деструкция фенантрена штаммами: А – *R. erythropolis* 108; Б - *A. guillouiae* 112

Протокатеховая кислота подвергается дальнейшей трансформации через механизм *орто*- или *мета*-расщепления [104]. Гентизиновая кислота, в свою очередь, метаболизируется до интермедиатов цикла Кребса: пирувата и фумарата [414].

Количество фенантрена в среде культивирования исследуемых штаммов резко снижалось уже на третьи сутки (рисунок 3.3.4). Однако при разложении фенантрена *R. erythropolis* 108 его количество продолжало снижаться в течение всего эксперимента, тогда как в случае *A. guillouiae* 112 остаточное количество фенантрена оставалось на уровне третьих суток. Возможно, это связано с ингибированием разложения накапливающимся интермедиатом, прежде всего, протокатеховой кислотой. Динамика разложения интермедиатов для исследуемых штаммов существенно различалась. Для *R. erythropolis* 108 было характерно снижение количества всех идентифицированных промежуточных соединений на протяжении всего эксперимента. В то же время в среде культивирования *A. guillouiae* 112 отмечалось накопление этих веществ.

Окисление антрацена, как и в случае нафталина и фенантрена, протекает по двум направлениям [415]:

1. С образованием протокатеховой кислоты из *о*-фталевой через 1,2-дигидроксиантрацен, *цис*-4(-2-гидроксинафт-3-ил)-2-кетомасляно-3-енойную кислоту, 6,7-бензокумарин и 3-гидрокси-2-нафтойную кислоту.
2. С образованием гентизиновой кислоты через антрацен-1,2-дигидродиол, 6,7-бензокумарин, 3-гидрокси-2-нафтойную кислоту, 2,3-дигидроксинафталин и салициловую кислоту.

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 были выявлены трудно идентифицируемые пики, свидетельствующие о присутствии в культуральной среде протокатеховой и гентизиновой кислот,

причем, примерно в равных количествах. Такие результаты можно объяснить сложностью химической структуры антрацена, в результате чего бактериальная атака и ферментативный метаболизм этого соединения осложнены.

Разложение модельных соединений дает, конечно, некоторое представление об эффективности разложения сложного субстрата микроорганизмом. Однако не всегда штаммы, эффективно разрушающие модели, будут 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 интермедиаты, являющиеся, согласно [406, 408], реперными соединениями деградации конденсированной ароматики.

Наиболее распространенный путь разложения фенантренов бактериями включает образование из них соединений нафталинового ряда и одноядерных ароматических соединений, среди которых ключевыми являются пирокатехин и один из его предшественников – салициловая кислота [406, 408]. Подтверждением данного пути деградации ПАУ может быть появление в культуральных средах бактерий гентизиновой кислоты – одного из продуктов окисления салициловой кислоты [406, 408]. Содержание в культуральной жидкости бактерий таких метаболитов, как протокатеховая и *о*-фталевая кислоты, может свидетельствовать об альтернативном пути деградации полициклических ароматических соединений [406], при котором в зависимости от *мета*- или *орто*- раскрытия ароматического кольца образуются такие ациклические продукты их деструкции, как карбокси-*цис*-*цис*-муконовая или 3-оксоадипиновая кислоты [407]. Присутствие в культуральных средах пирокатехина и протокатеховой кислоты может указывать на существование одновременно двух путей деградации фенантрена и нафталина бактериями.

Состав смеси ароматических соединений, определенный при ВЭЖХ экстрактов культуральных жидкостей шести наиболее перспективных штаммов бактерий, приведен в таблице 3.3.10.

Таблица 3.3.10 - Состав смеси ароматических соединений, обнаруженных в культуральных жидкостях различных штаммов бактерий

Соединение	Штаммы бактерий						
	108	112	114	90	102	109	контроль
Бензойная к-та	+	+	+	+	+	+	+
п-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	+	+	+	+	+	+	-
п-кумаровая к-та	Сл.	+	+	+	+	+	-
Феруловая к-та	Сл.	-	-	-	-	-	-
Коричный спирт	+	-	-	+	-	+	+
Коричный альдегид	+	+	-	+	-	+	+
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.

Оказалось, что для всех этих штаммов характерно присутствие в культуральном фильтрате салициловой кислоты. Это свидетельствует о том, что бактерии разлагают полициклические соединения по пути образования

пирокатехина. Однако пирокатехин был обнаружен только у двух штаммов (*R. erythropolis* 108 и *A. guillouiae* 114). Так, у штамма 108 он появился на второй неделе роста, а у штамма 114 – на пятой. Известно, что пирокатехин расщепляется бактериями до *цис-цис*-муконовой кислоты и 2-гидроксимуконового полуальдегида [407]. Интересно, что, при разложении модельных соединений салициловая кислота не детектируется ни в одном образце.

Так же, как и пирокатехин, протокатеховая кислота образовывалась в различные периоды культивирования штаммов 108, 112 и 90, что свидетельствует о существовании для них наряду с первым путем деградации полициклических ароматических соединений второго пути, в результате которого образуется промежуточный метаболит – *о*-фталевая кислота [406]. Интересно, что штаммы 112 и 114, относящиеся к одному виду *A. guillouiae*, деструктировали ПАУ различными путями. Так, в культуральной жидкости штамма 112 присутствовала, наряду с салициловой, и протокатеховая кислота. У штамма 114 разложение ПАУ протекало только по одному пути - с образованием салициловой кислоты и ее производного – пирокатехина. Следует отметить, что в течение 8 недель роста каждого из штаммов состав всех перечисленных идентифицированных соединений, как и их содержание, не были постоянными (таблица 3.3.10, рисунок 3.3.5). Результаты анализа этих изменений свидетельствуют о периодах возрастания и снижения максимальной деструктирующей активности бактерий. При этом период максимальной активности штаммов 114 и 102 достигался к 6 нед. роста, а 108, 112, 90 и 109 – к 8 нед. Продукты деструкции ряда компонентов, характеризующиеся максимумами поглощения в области 250–310 нм и периодом выхода при ВЭЖХ 7–17 мин, не были идентифицированы. Их состав для всех штаммов варьировал в разные периоды роста в течение 8 нед. (рисунок 3.3.5). Анализ хроматограмм ВЭЖХ с помощью библиотеки спектров “БД-2003-500” для “Милихром А-02” указывает на то, что часть этих компонентов относится к соединениям нафталинового ряда, а часть – к соединениям неизвестной структуры.

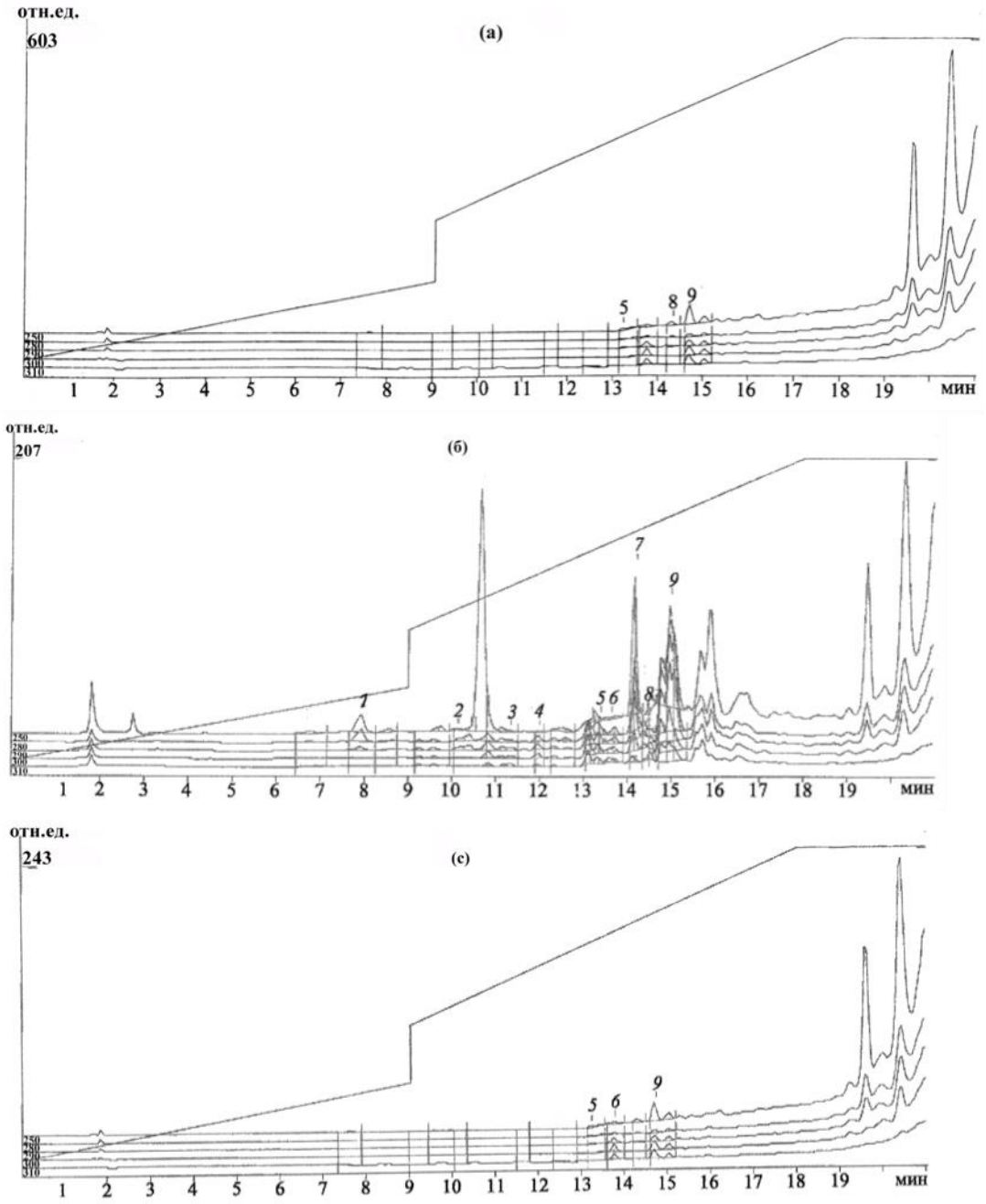


Рисунок 3.3.5 - ВЭЖ-хроматограммы: (а) - для экстрактов из контрольной среды без внесения бактерий, (б) и (в) - для экстрактов штаммов 108 и 102, полученных на 8 неделе наблюдений. 1- протокатеховая кислота; 2- сиреневая кислота; 3- *п*-кумаровая кислота; 4-феруловая кислота; 5- бензойная кислота; 6- салициловая кислота; 7- коричный спирт; 8 -коричная кислота; 9-коричный альдегид. По оси абсцисс –время выхода соединений, в мин; по оси ординат - интенсивность поглощения в условных единицах (отн. ед.).

Таким образом, показано, что все изученные штаммы бактерий способны эффективно разлагать полиароматические углеводороды, причем штаммы 90, 102, 109, идентифицированные как различные виды *Pseudomonas*, можно скорее отнести к содеструкторам нефти.

Несмотря на то, что преимущество в разложении нефти принадлежит бактериям, известны грибные культуры, способные эффективно разрушать данный субстрат [150].

Нами был проведен первичный скрининг различных по таксономической принадлежности грибов по способности расти на стерильных опилках, увлажненных до 60 % и пропитанных 5 % (об.) сырой нефти (таблица 3.3.11).

Таблица 3.3.11 - Результаты скрининга дереворазрушающих грибов

№	Наименование культуры	Степень обрастания опилок в баллах	Степень обесцвечивания опилок в баллах
1.	*Trametes versicolor* 2	5	5
2.	*Trametes versicolor* 082	1	1
3.	*Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725	1	0
4.	*Sporotrichum pulverulentum* 1766	5	5
5.	*S. pulverulentum* 1767	4	5
6.	*Trichaptum laricinum* 6	4	4
7.	*Daedaleopsis confragosa 10Э*	1	0
8.	*Fomitopsis pinicola* 0140	3	3
9.	*F. officinalis* 1126	4	4
10.	*Laetiporus sulphureus* 0796	2	1
11.	*Acremonium* sp.	0	0
12.	*Trichoderma lignorum* 81-17	1	1
13.	*Trichosporon cutaneum* Д-46	1	0
14.	*T. cutaneum* 5	1	0

Из 14 исследованных микроорганизмов лишь шесть были способны расти на нефтезагрязненном субстрате и очищать его. Все они относятся к высшим базидиальным грибам. Для этих образцов был проведен гравиметрический анализ (таблица 3.3.12) через два месяца культивирования.

Таблица 3.3.12 - Убыль нефти при культивировании грибов

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

Наиболее высокие результаты были получены для грибных штаммов, проявляющих максимальную дереворазрушающую активность. Вероятно, это связано с ко-метаболизмом древесины и нефти в данном эксперименте. В обоих случаях синтезируются внеклеточные оксидоредуктазные ферменты, способные разрушать как структурные единицы лигнина, так и ароматические соединения нефти.

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 открывает перспективы создания комплексного препарата, включающего как бактериальные, так и грибные культуры.

Таким образом, проведен первичный скрининг микроорганизмов как по способности разлагать исследуемый субстрат, так и по деструкции его

модельных соединений. В ходе работы были выбраны ассоциации, максимально эффективно метаболизирующие субстрат. Для опилок это комплекс непатогенных грибов *Trametes versicolor, Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 и 1 MR-1, *Sporotrichum pulverulentum* 1766 и 1767 и *Acremonium* sp. Для гидролизного лигнина предложена модификация существующей «закваски» *Trichoderma asperellum* 3. Скрининг микроорганизмов по способности разрушать сырую нефть 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 *Trametes versicolor* 2, *Sporotrichum pulverulentum* 1766 и 1767 оказались эффективны как для компостирования 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.

4 Симбиотическое взаимодействие микробных культур с почвенной биотой

Микроорганизмы, поступающие в почву вместе с микробными препаратами, вступают в различные взаимоотношения с микрофлорой и растениями, соответственно, необходимо знать пути их влияния на естественных обитателей почвы. В первую очередь важно понимать, как они влияют 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 микрофлору для создания наиболее благоприятных условий их роста и развития [404]. Микроорганизмы, попадающие в ризо- или эндосферу растений, способны нейтрализовать многие токсичные вещества, в частности, нефть и нефтепродукты, фенольные соединения, пестициды. Это происходит как за счет ферментативного разложения токсикантов, так и их иммобилизации или эмульгирования [416]. С другой стороны, не исключено и подавление роста и развития растения за счет появления в непосредственной близости от корня токсичных низкомолекулярных продуктов, образующихся в процессе деятельности микроорганизмов [417].

4.1 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.

Выбор рабочей концентрации нефти для проведения экспериментов осуществляли, используя стерильный песок с добавлением 0.5-3.0 % нефти.

Выяснилось, что добавка 3 % нефти значительно подавляет рост и развитие растений. Низкие концентрации нефти (до 1 %) не оказывают негативного воздействия. Внесение 2 % нефти подавляет рост растений примерно на 50 % (рисунок 4.1.1), поэтому для дальнейших экспериментов использовали эту концентрацию.

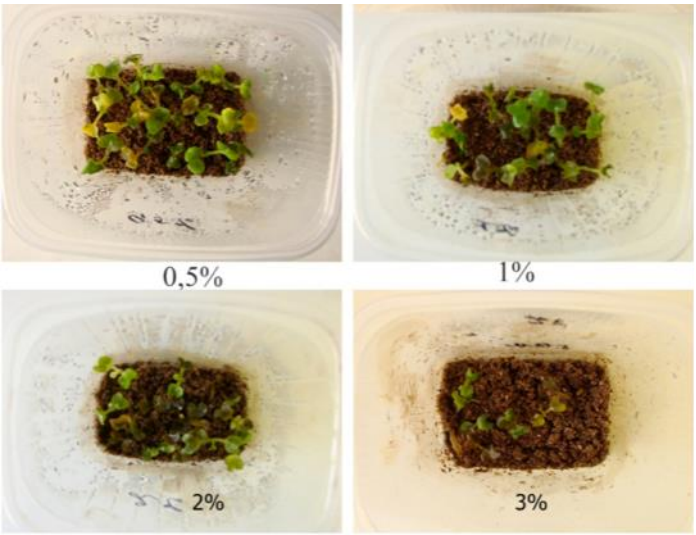


Рисунок 4.1.1 - Влияние различных концентраций нефти на развитие проростков редьки

При обработке субстрата сырой нефтью в концентрации 2 % наблюдалось ингибирование прорастания и роста семян растений. Всхожесть снижалась на 50 %, длина подземной и надземной частей растения и масса проростков - на 60 % (рисунок 4.1.2).

Рисунок 4.1.2 - Влияние нефти в концентрации 2 % на рост и развитие редьки: 1 - контроль; 2 – 2 % нефти

При инокуляции семян микроорганизмами (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 - *R. erythropolis* 108 (рисунки 4.1.3 - 4.1.7). Поэтому в дальнейших экспериментах использовали только эту культуру.

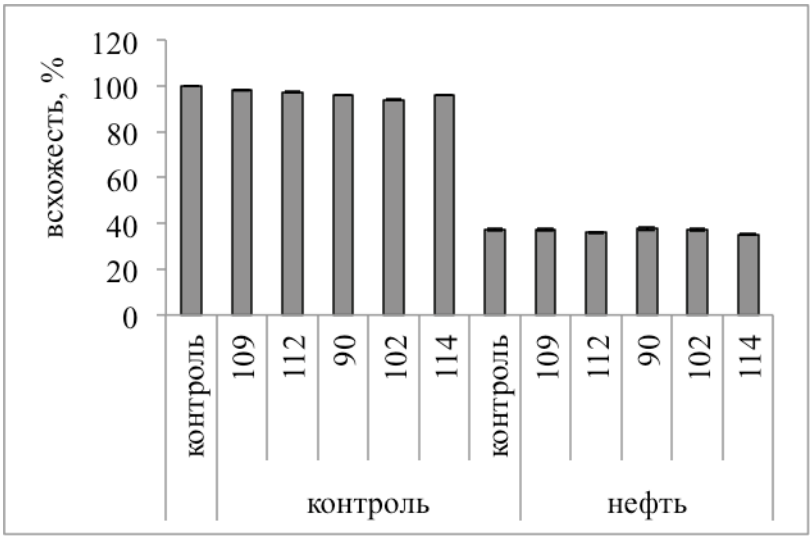


Рисунок 4.1.3 - Влияние инокуляции бактерий на всхожесть семян *Raphanus sativus*

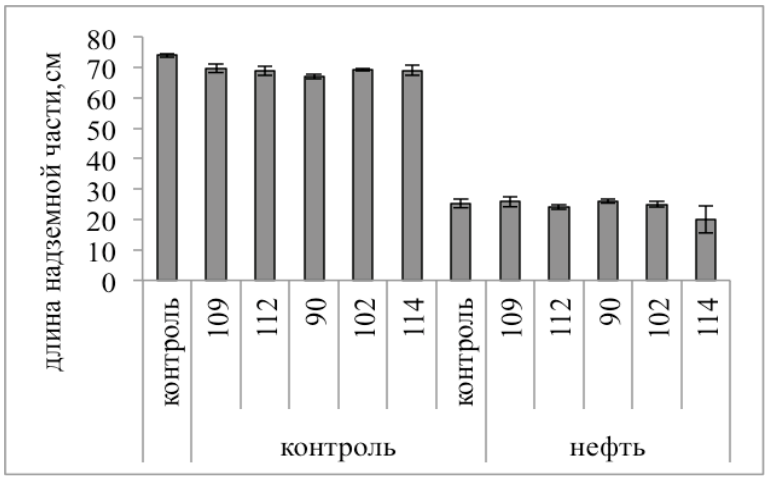


Рисунок 4.1.4 - Влияние инокуляции бактерий на длину надземной части *Raphanus sativus*

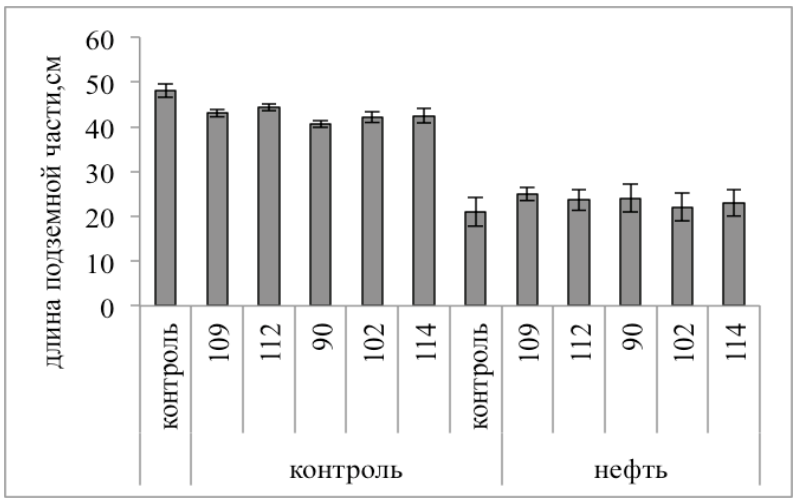


Рисунок 4.1.5 - Влияние инокуляции бактерий на длину подземной части *Raphanus sativus*

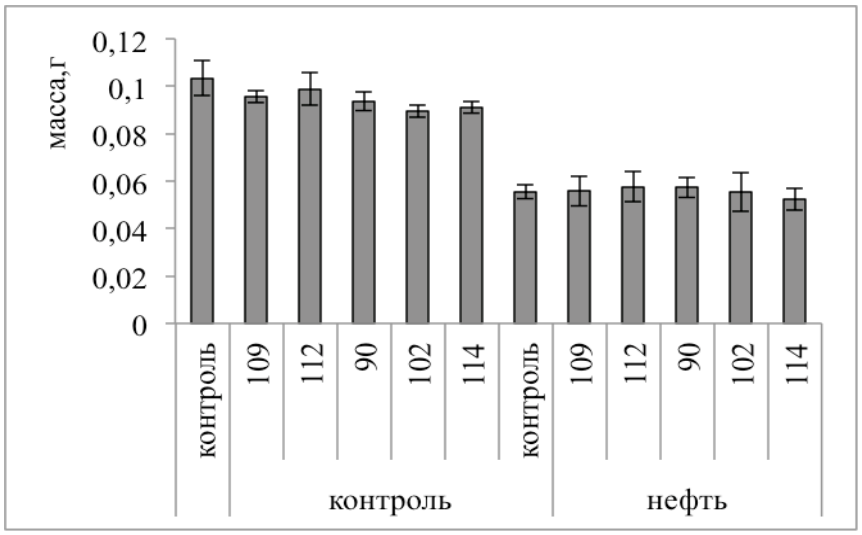


Рисунок 4.1.6 - Влияние инокуляции бактерий на массу проростков *Raphanus sativus*

Обработка семян суспензией бактерий *R. erythropolis* 108 повышала всхожесть на 25 % относительно контроля в условиях нефтезагрязнения (рисунок 4.1.7), а у полученных из этих семян растений наблюдалось увеличение длины корня на 50 % (рисунок 4.1.8), высоты надземной части и ее массы - на 40 %. Это свидетельствует о снижении ингибирующего действия нефти на растение.

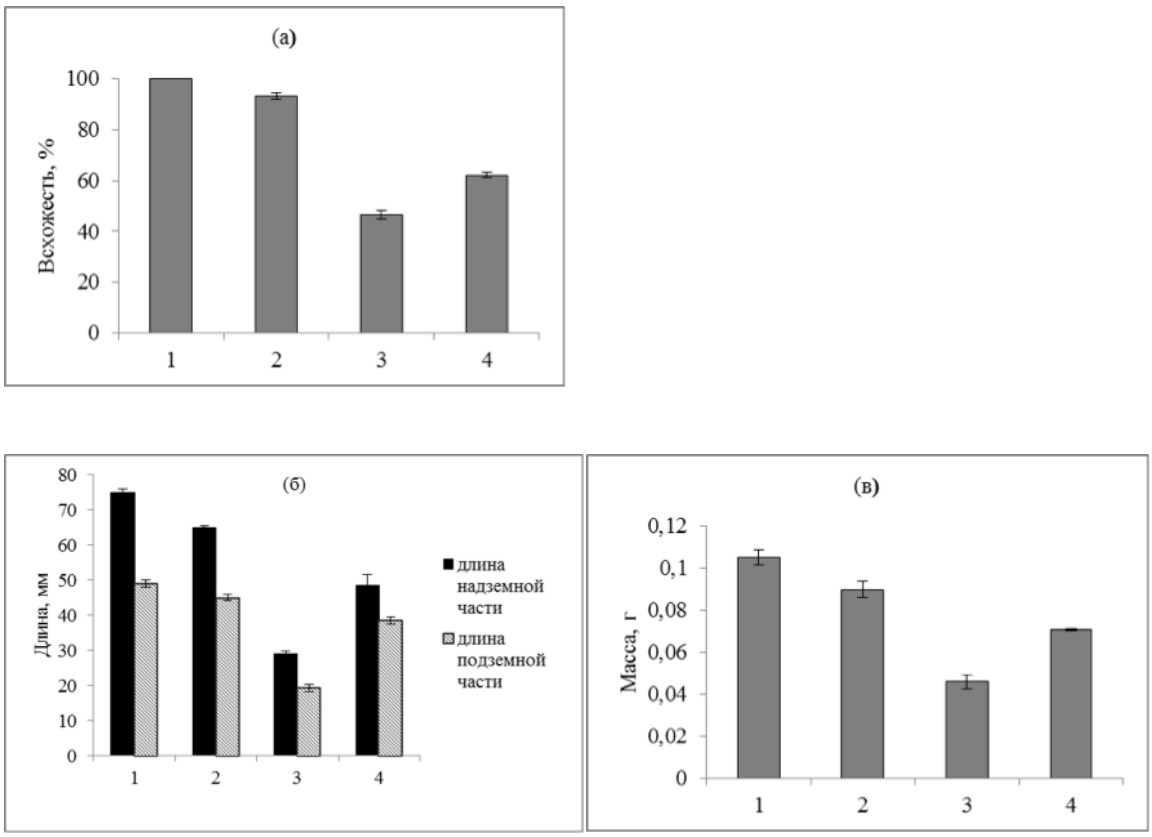


Рисунок 4.1.7 - Влияние инокуляции бактерий на морфологические параметры *Raphanus sativus* при добавлении нефти: а - всхожесть, б - длина надземной части, длина подземной части, в - масса проростков. 1 - контроль без добавления нефти и бактерий, 2 - 108 без нефти, 3 - нефть без бактерий, 4 - культура 108 с нефтью

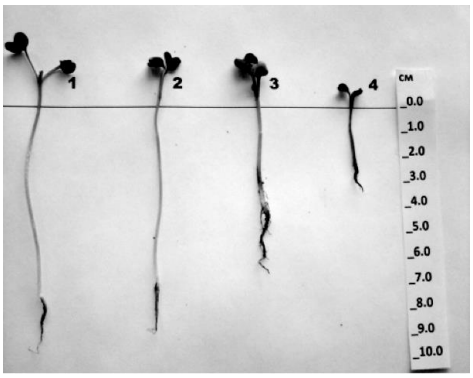
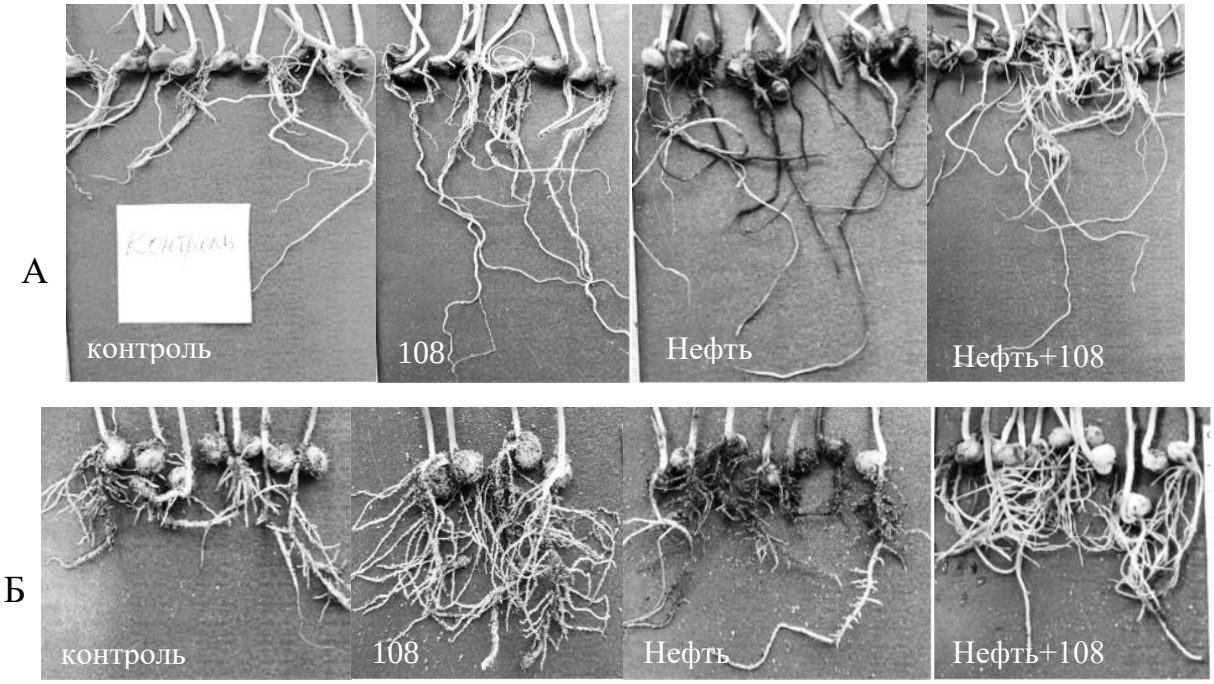


Рисунок 4.1.8 - Развитие *Raphanus sativus* при добавлении нефти и инокуляцией семян *R. erythropolis* 108. 1 - контроль без добавления нефти и бактерий, 2 - *R. erythropolis* 108 без нефти, 3 - *R. erythropolis* 108 с нефтью, 4 - нефть без бактерий

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). Нефтезагрязнение снижает всхожесть семян всех исследуемых растений на 20 – 50 % в зависимости от вида растения. Корни растений, выращенных в песке с добавлением нефти, отличались темным цветом, характерным для нефтяной пленки, и снижением количества боковых корешков. Это обусловлено недостаточным поступлением в прорастающее семя воды и кислорода, связанным с образованием нефтяной пленки на поверхности семени. Предобработка семян взвесью микроорганизмов существенно улучшала развитие корневой системы (рисунок 4.1.9) [418].



Корневая система: А – кукурузы; Б - гороха

Проростки растений также угнетаются под действием нефти, их общая длина и масса, а также количество пигментов значительно снижаются. Предобработка семян этим штаммом приводит к достоверному снижению токсического действия нефти на все исследуемые растения. Визуально заметно, что растения, выращенные из семян, обработанных *R. erythropolis* 108, в присутствии нефти лучше набирают листовую массу, чем необработанные растения (рисунок 4.1.10). Присутствие микроорганизмов

нивелировало негативный эффект нефти, восстанавливая всхожесть практически до уровня контроля [419]. Морфологические признаки таких растений также были близки к контрольным (таблица 4.1.1). Количество пигментов восстанавливалось до исходного уровня, а в некоторых случаях превышало его (таблицы 4.1.1 - 4.1.5). Вероятно, это связано с синтезом микроорганизмами биологически активных веществ, аналогичных цитокининам растений [420].

Интересно, что при выращивании обработанных микроорганизмами растений в незагрязненной почве наблюдался небольшой ростостимулирующий эфффект, проявляющийся в увеличении всхожести семян. Стимуляция синтеза пигментов, особенно каротиноидов, характерная для *R. erythropolis* 108, приведет к улучшению питания растений, что положительно скажется на их урожайности. Это открывает перспективы использования родококка в качестве биоудобрения.

Рисунок 4.1.10 - Внешний вид растений: А - горох, Б - кукуруза, В - салат, Г – райграс. 1 – контроль, 2 – нефть, 3 – нефть+108

Таблица 4.1.1 - Влияние нефти и обработки *Rhodococcus erythropolis* 108 на рост растений

Культура	Всхожесть, %	Длина надземной части растения, см	Длина корней, см	Масса, г
Кукуруза				
контроль	77	14.13±1.0	11.76±0.9	7.9±0.5
R. erythropolis 108	83.3	13.3±0.9	11.9±0.9	4.8±0.2
Нефть	60.4	5.4±0.5	7.8±0.5	5.5±0.2
R. erythropolis 108 +Нефть	62.4	9.63±0.9	12.6±1.0	9.01±0.6
Горох				
контроль	29.7	10.35±0.8	6.75±0.7	4.45±0.3
R. erythropolis 108	33.3	11.75±1.0	6.5±0.5	6.0±0.6
Нефть	11.7	6.27±0.5	4.17±0.2	3.35±0.2
Нефть+ *R. erythropolis* 108	35.3	11.2±0.9	5.05±0.5	4.8±0.4
Редька				
контроль	100	7.49±0.8	4.88±0.5	4.7±0.5
R. erythropolis 108	93,3	6.5±0.5	4.5±0.3	4.5±0.4
Нефть	46.6	2,9±0.2	1,93±0.2	0.79±0.09
Нефть+ *R. erythropolis* 108	62.2	4,85±0.2	3,85±0.3	2.97±0.2

Таблица 4.1.2 - Содержание пигментов в растениях гороха, мг/г сырой массы

	Пигменты		
	Хлорофилл *а*	Хлорофилл *в*	Каротиноиды
1й эксперимент			
контроль	1.2±0.1	0.54±0.07	0.77±0.1
R. erythropolis 108 без нефти	1.2±0.1	0.46±0.02	0.84±0.05
нефть	0.84±0.1	0.32±0.04	0.62±0.07
R. erythropolis 108+нефть	0.96±0.1	0.35±0.05	0.71±0.1
2й эксперимент			
Контроль	0.83±0.03	0.29±0.01	0.59±0.03
Нефть без бактерий	0.81	0.28	0.62
R. erythropolis 108 +Нефть	0.99±0.04	0.40±0.14	0.75±0.04

Таблица 4.1.3 - Содержание пигментов в растениях гороха, мг/г сухой массы

	Пигменты		
	Хлорофилл *а*	Хлорофилл *в*	Каротиноиды
2й эксперимент			
контроль	10.36±1.6	3.95±0.6	7.53±1.1
R. erythropolis 108 без нефти	12.43±0.9	3.88±0.2	8.96±0.5
нефть	7.00±0.8	2.89±0.2	5.20±0.5
R.erythropolis 108+нефть	9.26±0.8	3.38±0.57	6.88±0.5

Таблица 4.1.4 - Содержание пигментов в растениях кукурузы, мг/г сырой массы

	Пигменты		
	Хлорофилл а	Хлорофилл в	Каротиноиды
1й эксперимент			
контроль	1.035144±0.08	0.310469±0.03	0.684893±0.04
нефть	0.586607±0.03	0.173092±0.01	0.325994±0.03
R. erythropolis 108 +Нефть	0.944747±0.07	0.164213±0.01	0.666824±0.04
2й эксперимент			
контроль	1.11±0.1	0.28±0.03	0.74±0.1
R. erythropolis 108 без нефти	1.25±0.1	0.35±0.04	0.80±0.1
нефть	0.55±0.01	0.07±0.007	0.40±0.1
R.erythropolis 108+нефть	0.85±0.08	0.29±0.01	0.60±0.06

Таблица 4.1.5 - Содержание пигментов в растениях кукурузы, мг/г сухой массы

	Пигменты		
	Хлорофилл *а*	Хлорофилл *в*	Каротиноиды
1й эксперимент			
контроль	11.5±0.08	3.45±0.28	7.61±0.47
нефть	70.4±1.05	2.08±0.20	5.48±0.80
Нефть+ *R. erythropolis* 108	10.90±0.4	1.89±0.14	7.69±0.14
2й эксперимент			
контроль	14.42±1.67	3.70±0.4	9.64±1.3
R. erythropolis 108 без нефти	12.98±1.7	3.59±0.4	8.23±1.1
нефть	5.87±0.1	0.71±0.07	4.30±0.1
R.erythropolis 108+нефть	8.79±0.9	3.01±0.07	6.10±0.1

Таким образом, нами выявлен микроорганизм (*R. erythropolis* 108), проявляющий фитозащитные свойства относительно всех исследованных растений. Снижение токсичесого действия нефти способствует увеличению длины корней и проростков, а также массы растения. Кроме того, обнаружен его стимулирующий эффект на рост и развитие растений, выросших в отсутствие нефти. Наблюдаемое во всех экспериментах увеличение содержания пигментов очень важно для улучшения фотосинтеза растений.

4.2 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* [137, 421], *Candida lipolytica* [422].

Кроме того, биосурфактанты могут широко использоваться в нефтедобывающей и горнодобывающей, химической и фармацевтической промышленности, а также для очистки окружающей среды от углеводородов, тяжелых металлов и других загрязнителей [423].

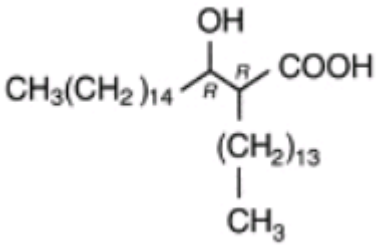
Первичная оценка способности выделять поверхностно-активные вещества осуществлялась косвенными методами для всех исследуемыых микроорганизмов. Для интенсификации синтеза биосурфактантов микроорганизмы выращивались на питательной среде с гексадеканом в качестве единственного источника углерода. Оказалось, что все грибы и *Streptomyces asterosporus* этой способностью не обладают. Бактерии и дрожжи синтезировали внеклеточные биосурфактанты (эмульгирование гексадекана, образование чистой зоны при добавлении на поверхность нефти супернатанта) (таблица 4.2.1). 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 хорошими продуцентами внеклеточных форм.

Таблица 4.2.1 - Показатели способности бактерий - нефтедеструкторов выделять поверхностно-активные вещества

Штамм	Диаметр чистых зон, см	Эмульги-рующая активность	Индекс эмульгирования, %	Количество сурфактантов	
				Клеточно-связанных%	Внеклеточ-ных, г/л
R. erythropolis 108	4.0±0.2	++	73	37.0	1.523
A. guillouiae 112	3.2±0.4	+	57	31.5	0.177
A. guillouiae 114	1.5±0.2	+	13	31.2	0.166
T. cutaneum D-46	0	++	54	63.3	0.891
T.cutaneum 5	0	++	52	25.2	0.181

Качественные реакции выявили в составе бактериальных биосурфактантов углеводный и липидный компоненты, а также отсутствие пептидов и высокомолекулярных углеводов (таблица 4.2.2). Установлено, что дрожжеподобные грибы синтезируют вещества липидной природы. Согласно литературным данным, дрожжи рода *Candida* могут выделять кориномиколовые кислоты:



аналогичные сурфактантам *Corynebacterium* sp. [227]. Вероятно, биосурфактанты, продуцируемые исследованными *T. Cutaneum,* также представлены жирными кислотами.

Таблица 4.2.2 - Химический состав биосурфактантов (качественные реакции)

Качественная реакция	Штамм микроорганизма				
	R. erythropolis 108	*A. guillouiae 112*	*A. guillouiae 114*	*T. cutaneum (beigelii)* D-46	*T.cutaneum* 5
Нингидрино-вая	-	-	-	-	-
Биуретовая	-	-	-	-	-
Йодная	-	-	-	-	-
Реакция Троммера	+	+	+	-	-
Реакция Гольдмана	+	+	+	+	+

На ТС-хроматограмме выделенных экстракцией сурфактантов *R. erythropolis* 108 детектируется одно компактное пятно с R_f 0.78. Это свидетельствует о наличии одного либо нескольких очень близких по структуре биосурфактантов, что не позволяет разделить их методом ТСХ. Пятна, полученные для *A. guillouiae* 112 и *A. guillouiae* 114, сливались в одну слабо окрашенную полосу, не позволяющую определить количество веществ, находящихся в экстракте.

Для *R. erythropolis* 108 и *A. guillouiae* 114 были сняты ИК-спектры в тонкой пленке (рисунок 4.2.1, 4.2.2). Наиболее интенсивными в обоих спектрах являются полосы валентных колебаний CH_2 групп в интервале 2950-2855 $см^{-1}$ и деформационных колебаний этих групп при 1460 и 722 $см^{-1}$. В спектре биосурфактанта, продуцируемого штаммом *Rhodococcus* 108 (рисунок 4.2.1), широкая полоса поглощения в интервале 3400-2600 $см^{-1}$

характеризует колебания ν(OH) ассоциированных гидроксильных групп. Полоса ν(C=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 CH_2-O-CH_2. Колебанию ν(C=O) свободной карбонильной группы соответствует слабое плечо при 1738 см$^{-1}$ на высокочастотном крыле полосы при 1652 см$^{-1}$. Дублетная полоса колебаний δ(CH_3) при 1375 см$^{-1}$ свидетельствует о возможном наличии разветвлённых C(CH_3)$_2$-групп. Следовательно, биосурфактант, продуцируемый *Rhodococcus* 108, обладает сложной структурой, включающей длинноцепочечные алифатические углеводороды, эфирные, карбонильные и OH-группы. Полученные данные позволяют предположить, что он представляет собой сложный эфир трегалозы и миколовых кислот.

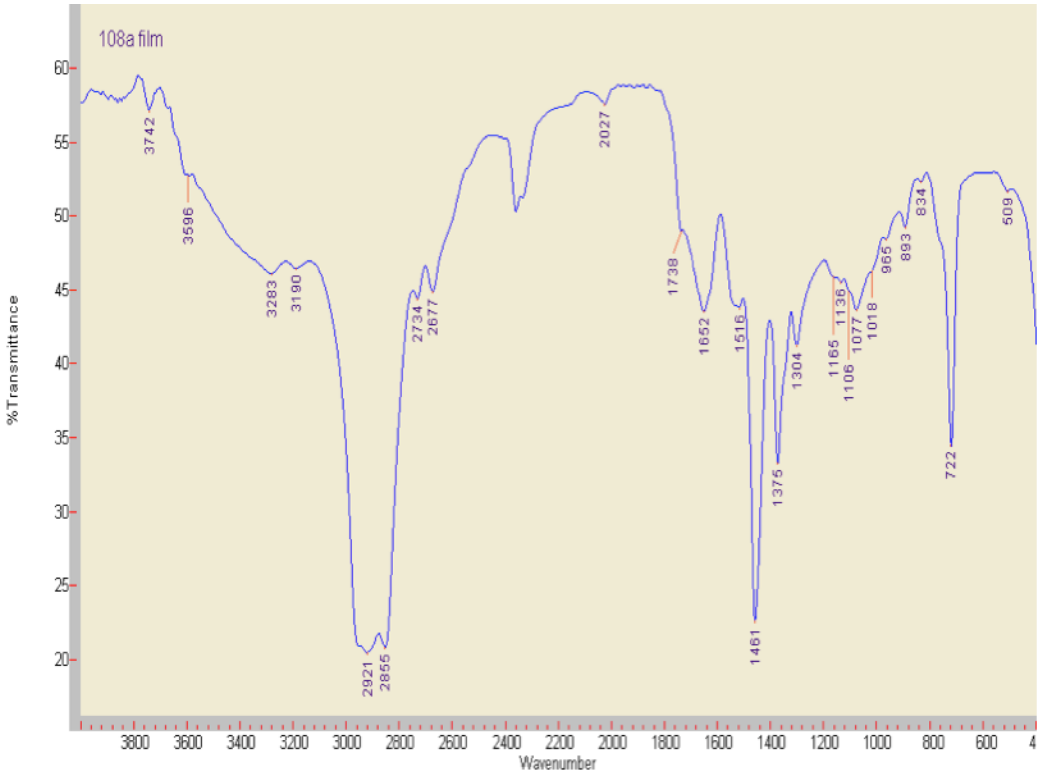


Рисунок 4.2.1 - ИК-спектр биосурфактанта, продуцируемого *R. erythropolis* 108

В ИК-спектре биосурфактанта, продуцируемого штаммом *Acinetobacter* 114 (рисунок 4.2.2), наряду с интенсивными полосами ν(CH_2), δ(CH_2) и δ(CH_3), наблюдаются характеризующие его полосы, аналогичные

наблюдаемым в спектре биосурфактанта, продуцируемого *Rhodococcus* 108, но еще менее интенсивные. Так, слабая широкая полоса ν(OH) ассоциированных гидроксильных групп находится в интервале 3500-3200 см$^{-1}$ и имеет слабо выраженный максимум при 3390 см$^{-1}$. Колебания ν(C=O) ассоциированных и свободных карбонильных групп характеризуются слабой полосой при 1650 см$^{-1}$ и плечом на ее крыле при 1690 см$^{-1}$ соответственно. Полоса с максимумом при 1078 см$^{-1}$ обусловлена колебаниями эфирного фрагмента.

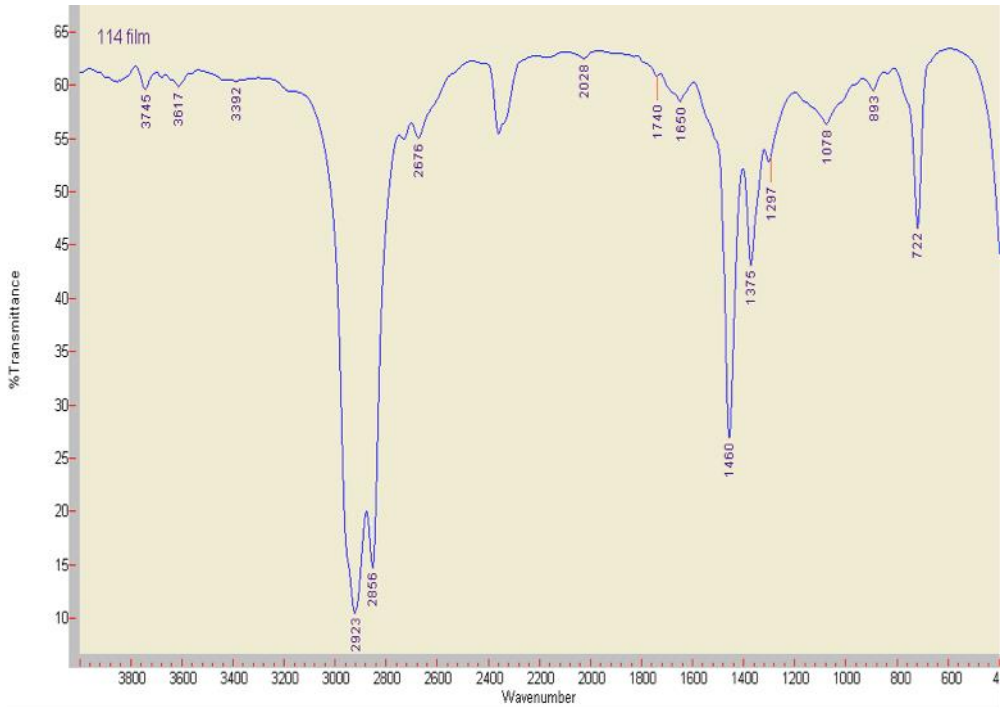


Рисунок 4.2.2 - ИК-спектр биосурфактанта, продуцируемого *A. guillouiae* 114

Наличие в элементном составе азота позволяет предположить, что биосурфактант представляет собой липополисахарид, состоящий из трисахаридной основы (*D*-галактозамин + *D*-галактозаминуроновая кислота + диоксиаминогексоза), к которой через сложноэфирную и амидную связь присоединены остатки жирных кислот (C_{10} – C_{22}).

Обнаруженная нами способность *R. erythropolis* 108 продуцировать биосурфактанты позволила предположить, что одним из возможных механизмов положительного влияния на выживаемость растений в условиях нефтезагрязнения является эмульгирование нефтяной пленки на поверхности

корней. Для подтверждения этой гипотезы было проведено исследование зоны корневых волосков с помощью световой микроскопии (рисунок 4.2.3). У растений, выращенных в условиях нефтезагрязнения, эта зона оказалась покрытой нефтяной пленкой, а количество корневых волосков было незначительно. В варианте «нефть+микроорганизм» 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. При этом у инокулированных растений в области корневых волосков наблюдались скопления, вероятно, микробных клеток, адсорбирующихся на корнях (рисунок 4.2.4).

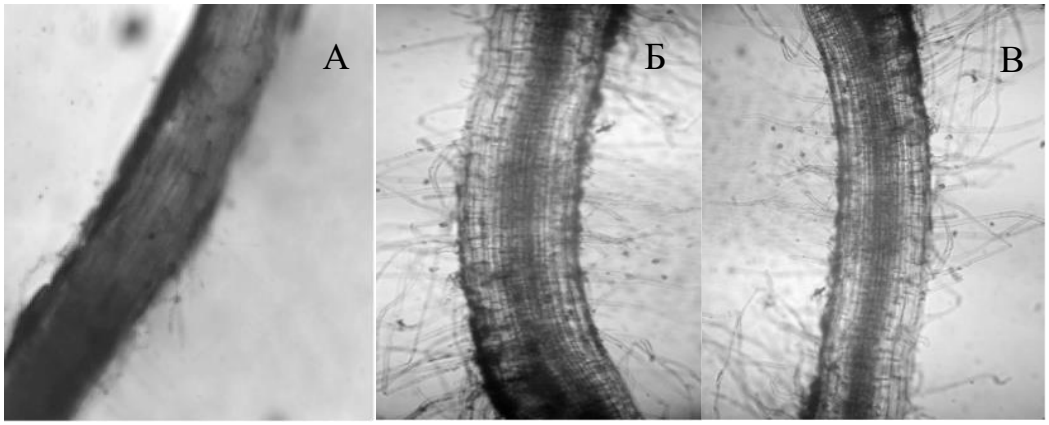


Рисунок 4.2.3 - Развитие корневой системы редьки масличной при добавлении нефти. А - нефть без бактерий, Б - нефть и добавление штамма108, В - контроль без добавления нефти и бактерий, х100.

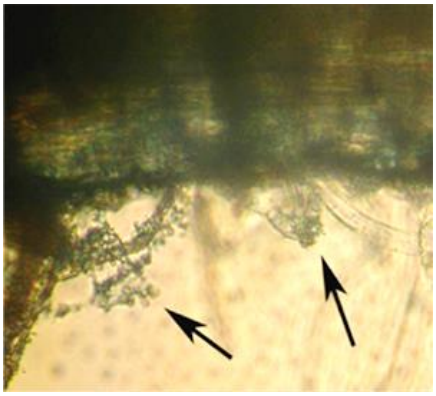


Рисунок 4.2.4 - Скопление микроорганизмов на корневых волосках редьки масличной, х200.

4.3 Синтез микроорганизмами биологически активных веществ

Большинство микроорганизмов, взаимодействующих с растениями, способно синтезировать вещества с фитогормональной активностью, витамины, некоторые органические кислоты, аминокислоты, антибиотики, биосурфактанты и др. Несмотря на то, что синтез фитогормонов считается прерогативой симбиотических или фитопатогенных микроорганизмов [424], многие свободноживущие микроорганизмы также способны их продуцировать [208, 216, 425]. Интересно, что синтезировать фитогормоны способны даже условно-патогенные и патогенные для человека штаммы [426].

В связи с тем, что микроорганизмы, используемые нами для биодеградации органических субстратов, неизбежно будут контактировать с растениями, в том числе с агрокультурами, необходимо оценить их внеклеточные метаболиты, прежде всего, фитогормоны.

Суммарная гиббереллиноподобная активность (ГПА) была обнаружена у всех грибов, за исключением дрожжеподобных (таблица 4.3.1). Большинство грибов проявляло ГПА в использованных биотестах. Только культуральный фильтрат *P. citreo-viride* максимально удлинял колеоптили салата (на 86 %), но был неспособен мобилизовать глюкозу в беззародышевых половинках семян ячменя. Известно, что один и тот же гиббереллин может быть активным в одном биотесте и совершенно неактивным в другом [346]. Максимальная активность была зафиксирована у *S. pulverulentum* 1767**.** Среди бактериальных культур наибольшую ГПА проявил штамм *Pseudomonas* sp. 102, скорость мобилизации глюкозы которым в эндоспермальном тесте соответствовала таковой для промышленных гиббереллинов. Остальные штаммы данной активностью не обладали.

Ауксиновая активность исследуемых микроорганизмов была индуцибельной: при выращивании их на средах без триптофана фитогормоны этого класса не обнаружены. Добавление аминокислоты к

среде приводило к стимуляции синтеза ауксинов практически у всех культур (таблица 4.3.1). Высокая физиологическая активность выделяемых ауксинов подтверждалась биотестами.

Оказалось, что штаммы 102 и 109 содержат около 0.03 % ауксинов и проявляют достаточно высокую активность в биотестах. Эти культуры относятся к роду *Pseudomonas*, который, согласно литературным данным [427] обладает высокой приспособительной способностью и, соответственно, большим разнообразием биологически активных веществ. Среди бактериальных культур выделялся *R. erythropolis* 108, синтезировавший наибольшее количество ауксинов, однако их биологическая активность проявлялась не во всех биотестах. Интересные результаты получены для культуры *P. corrugate* 90, для которой практически не обнаружено ауксиноподобных веществ, определяемых реактивом Сальковского. В то же время, супернатант этого штамма характеризовался очень высокой активностью в биотестах на ауксины.

Грибные штаммы (за исключением *P. citreo-viride,* активность которого практически не отличалась от контроля) были активны в биотестах на ауксины. Лишь *T. cutaneum* D-46, резко снижая всхожесть горчицы, не стимулировал корнеобразование у фасоли. Максимальное количество ауксинов обнаружено у *T. cutaneum* 5. 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 различалось в два раза.

Таблица 4.3.1- Физиологическая активность и количество фитогормонов в культуральных фильтратах микроорганизмов

Вид микроорганизма	Длина колеоп-тилей салата, мм	Количество гиббереллино подобных веществ[1], мг/мл	Количество проросших семян горчицы, % от контроля	Количество корней фасоли, % от контроля	Количество ауксинов, мг/мл
контроль (стерильная соответствующая питательнвая среда)	0.57±0.02	0	30	100	0
Trichosporon cutaneum D-46	0.36±0.01	0	47	95.9±0.9	0.0064±0.0008
T. cutaneum 5	0.35±0.02	0	30	150±1.8	0.011±0.0009
Trametes versicolor	0.43±0.04	0.005±0.0004	57	133.3±1.2	0.009±0.0003
Phanerochaete chrysosporium ATCC 24725	0.81±0.05	0.002±0.0002	97	95.9±1.0	0
Phanerochaete chrysosporium 1 MR-1	0.93±0.05	0.0045±0.0004	63	129.2±1.0	0.0051±0.0004
Sporotrichum pulverulentum 1767	0.97±0.04	0.01±0.0008	90	79.2±0.9	0

Продолжение таблицы 4.3.1					
Вид микроорганизма	Длина колеоп-тилей салата, мм	Количество гиббереллино подобных веществ[1], мг/мл	Количество проросших семян горчицы, % от контроля	Количество корней фасоли, % от контроля	Количество ауксинов, мг/мл
Penicillum citreo-viride	1.06±0.06	0	93	108.3±0.9	0.0027±0.0001
Acremonium sp.	0.94±0.04	0.0055±0.0002	28	83.3±0.5	0.0027±0.0002
P. oryzihabitans 102	не опр.	0.038±0.002	38	173.1±1.2	0.003±0.0003
A. guillouiae 112	не опр.	0.0074±0.0006	89	100.0	0.0015±0.0002
R. erythropolis 108	не опр.	0	14	110.0±1.4	0.051±0.0009
A. guillouiae 114	не опр.	0.0052±0.0003	93	89.8±1.3	0.0011±0.0001
Pseudomonas sp. 109	не опр.	0.0065±0.0003	34	220.5±1.8	0.0035±0.0003
P. corrugate 90	не опр.	0	24	230.7±2.1	следы

1- количество гиббереллиноподобных веществ определено по эндоспермальному тесту

ТСХ экстрактов культуральных фильтратов грибных культур выявила наличие одного индольного пятна, R_f и окраска которого соответствовали β-3-индолилуксусной кислоте. Кроме того, для дрожжеподобных грибов обнаружена γ-(3-индолил)-масляная кислота, а *T. cutaneum* D-46 синтезировал еще одно неидентифицированное соединение индольной природы.

Еще одними из важных для растений внеклеточных метаболитов являются аминокислоты. Микроорганизмы способны синтезировать практически все аминокислоты, которые легко усваиваются растениями через корневую систему [428]. Исследование аминокислотного состава дрожжеподобных грибов и актиномицета выявило присутствие большинства аминокислот, входящих в состав природных белков (таблица 4.3.2) [429]. Максимальная концентрация и разнообразие аминокислот отмечены для актиномицета *S.asterosporus*. При этом основная доля (61.5 %) приходилась на глутамин, содержание цистина также значительно (11.4 %). Спектр аминокислот у дрожжеподобных грибов зависит от штамма. Так, *T.cutaneum* 5 отличается более широким набором свободных аминокислот и почти вдвое большей их концентрацией. Преобладающими оказались цистин (33.4-34.2 % от общего содержания, в зависимости от штамма), аланин (24.5-25.8 %), валин (7.7-10.8 %), γ-аминомасляная кислота (7.2-10.0 %).

Таблица 4.3.2 - Содержание аминокислот (нмоль/мл) в культуральных фильтратах микроорганизмов

Аминокислоты	*Streptomyces asterosporus*	*Trichosporon cutaneum* D-46	*Trichosporon cutaneum* 5
Цистеиновая	21.51	38.73	59.17
Аспарагиновая	27.72	-	-
Треонин	184.29	-	-
Серин	146.58	-	-
Аспарагин	153.06	-	-
Глутаминовая	83.64	-	-

Глутамин	3958.33	-	-
Глицин	238.10	92.59	126.98
Аланин	473.48	422.08	757.58
Цитруллин	7.06	-	-
α-аминомасляная	67.04	41.26	69.62
Валин	-	140.98	171.76
Цистин	446.75	218.18	363.64
Метионин	-	4.83	37.40
Изолейцин	162.45	19.11	57.33
Лейцин	192.90	13.23	44.97
Тирозин	88.33	29.59	53.25
Фенилаланин	198.57	22.06	52.95
γ-аминомасляная	10.51	149.31	182.49
Орнитин	87.54	-	3.50
Лизин	10.50	-	16.39
Гистидин	-	-	5.97

4.4 Влияние культуральных фильтратов дереворазрушающих грибов на растения и почву

Влияние микроорганизмов на растения, как правило, связано с их способностью синтезировать биологически активные соединения, в частности, фитогормоны и аминокислоты. Поэтому мы изучили содержание фитогормонов и аминокислот в культуральных фильтратах микроорганизмов, а также их влияние на развитие растений.

Обработка семян культуральными фильтратами сказалась на их всхожести. Так, количество взошедших семян ячменя заметно увеличивалось (до 131 % в случае *P.citreo-viride*), для кукурузы наблюдалось варьирование результатов от 75 % у *Acremonium* sp. до 113 % у *P.citreo-viride* (рисунок 4.4.1). Всхожесть

пшеницы либо не зависела от обработки, либо незначительно снижалась. Усиление энергии прорастания семян, обогащенных микробными метаболитами, может происходить только благодаря активации в них биохимических процессов, т.к. в этот период проростки развиваются исключительно за счет запасных питательных веществ семени. Это сказывается в дальнейшем на физиологических процессах, протекающих в проростках и в растении на более поздних стадиях развития, что, в конечном счете, приводит к повышению урожая и во многих случаях к улучшению его качества [430].

В вегетационных опытах (таблица 4.4.1) наблюдалось достоверное увеличение средней длины и массы корней ячменя. Преобладающее увеличение массы подземной части растений по сравнению с длиной свидетельствовало об образовании большего числа боковых корней у растений, выросших из обработанных культуральными фильтратами семян. Индукция ауксина в культуральных фильтратах не изменила общей картины. Действие культурального фильтрата *S. pulverulentum*, содержащего 100 мкг/мл ГПВ, было подобно влиянию гиббереллина в той же концентрации [431]. В то же время влияние предпосевной обработки аминокислотами на рост ячменя в значительной степени соответствовало действию культуральных фильтратов (таблица 4.4.1), причем стимуляция роста корней культуральным фильтратом *S. asterosporus* превышала таковую. Аланин, содержащийся в культуральном фильтрате *T.cutaneum* 5 в наибольшем количестве, оказывал на корни злаков воздействие, аналогичное действию самого фильтрата. Возможно, стимулирующее действие *T. cutaneum* связано с выделением им в культуральную среду именно этой аминокислоты. Реакция семян ячменя на обработку культуральным фильтратом *S. asterosporus* коррелировала с влиянием как аланина, так и смеси аминокислот. Глутамин, находящийся в культуральном фильтрате *S. asterosporus* в максимальном количестве, в чистом виде не оказывал влияния на корнеобразование. Вероятно, воздействие комплекса аминокислот интенсифицирует ростовые процессы корня. Стимуляция корнеобразования даст растению преимущества в поглощении

воды и питательных веществ, что в дальнейшем положительно скажется на урожайности сельскохозяйственных культур.

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. Наилучшие результаты для надземной части растений были получены при обработке семян ячменя культуральными фильтратами *T.cutaneum* 5.

Средняя длина корней пшеницы в большинстве случаев незначительно отклонялась от контроля (таблица 4.4.2). Масса корней почти во всех вариантах существенно выше; наилучшие результаты были отмечены для культурального фильтрата *P. citreo-viride*. Длина и масса надземной части лишь немного ниже контроля, а для *T. cutaneum* 5 при длине стебля, сравнимой с контролем, масса существенно превышала контроль. Все культуры, выращенные на средах с триптофаном, значительно увеличивали длину и массу проростков пшеницы. Оба штамма *T. cutaneum* и *T. versicolor* в большей степени увеличивали массу подземной части растений, а *Acremonium* sp., *P. chrysosporium* ATCC 24725 и *S. pulverulentum* 1767- длину. Действие *P. chrysosporium* 1 MR-1 оказалось более сложным. Для надземной части наблюдалась преимущественная стимуляция длины ростка, а для подземной - массы. Скорее всего, это связано с наличием в культуральных фильтратах как ауксинов, так и ГПВ в равных концентрациях.

При обработке семян аминокислотами отмечалось значительное увеличение длины корней (исключение составлял лишь глутамин, не влияющий на удлинение корня), в то время как их масса превышала контроль лишь в двух вариантах опытов (таблица 4.4.2). Таким образом, корреляции между действием исследованных аминокислот и культуральных фильтратов для пшеницы не выявлено.

Семена гороха оказались более отзывчивыми на обработку культуральными фильтратами, особенно содержащими ауксины (таблица 4.4.3). Среди культур выделялся *S. Pulverulentum,* который, не обладая

ауксиновой активностью, 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 в данном случае сказалось действие ГПВ [432].

Культуральные фильтраты исследуемых культур ингибировали рост стебля и корневой системы кукурузы (таблица 4.4.4). Исключением стал культуральный фильтрат *T.cutaneum* 5, воздействие которого привело к увеличению массы корней за счет развития боковых корешков. Известно, что при применении культуральных фильтратов микроорганизмов-стимуляторов в наибольшей степени эффект проявляется на росте корней, масса которых может увеличиваться на 15-60 % [433]. В частности, Э. И. Коломиец с соавторами было показано корнестимулирующее действие *T.cutaneum* на семена огурцов [434].

Таблица 4.4.1 - Влияние предпосевной обработки семян культуральными фильтратами на рост ячменя

Фракции	Росток				Корень			
	длина		масса		длина		масса	
	см	%	мг	%	см	%	мг	%
Trichosporon cutaneum D-46	14.0±0.9	93	27.7±0.9	109	13.7±0.9	114	5.3±0.1	135
T. cutaneum 5	15.1±1.0	100	38.5±1.2	128	12.6±0.7	105	5.9±0.1	128
Trametes versicolor	9.8±0.8	126	34.8±1.1	139	5.2±0.2	198	6.4±0.09	206
Sporotrichum pulverulentum 1767	8.7±0.8	112	26.5±0.9	106	3.2±0.2	121	5.6±0.05	118
Streptomyces asterosporus	13.6±1.1	90	40.5±1.3	135	15.7±0.8	131	7.0±0.2	178
Penicillum citreo-viride	13.4±1.0	89	37.2±1.0	124	15.2±0.9	127	6.4±0.1	139
Acremonium sp.	12.3±0.9	82	31.5±0.9	105	15.8±0.8	132	6.2±0.09	135
Phanerochaete chrysosporium ATCC 24725	8.8±0.6	113	28.4±0.9	113	5.1±0.5	195	4.2±0.08	137
Phanerochaete chrysosporium 1 MR-1	14.6±1.0	97	35.0±1.0	123	11.9±0.5	100	4.6±0.08	100
Гетероауксин	13.8±0.9	92	28.2±-0.9	94	13.4±0.8	112	4.6±0.09	100
Гиббереллин	12.5±0.9	83	23.7±0.5	79	10.8±0.5	90	4.1±0.08	90
Глутамин	не опр.		не опр.		12.1±0.5	100	4.5±0.1	100
Глицин	не опр.		не опр.		12.0±0.3	100	4.6±0.08	116
Аланин	не опр.		не опр.		13.0±0.5	108	5.5±0.08	119
Валин	не опр.		не опр.		11.8±0.3	97	5.3±0.09	113
Смесь аминокислот	не опр.		не опр.		13.3±0.4	110	5.4±0.06	115
Контроль	15.0±1.1	100	30.0±0.8	100	12.0±1.0	100	4.6±0.08	100

Таблица 4.4.2 - Влияние предпосевной обработки семян культуральными фильтратами на рост пшеницы

Микроорганизм	Росток				Корень			
	длина		масса		длина		масса	
	см	%	мг	%	см	%	мг	%
Trichosporon cutaneum D-46	18.3±1.1	91	88.0±3.0	83	15.5±0.9	105	4.7±0.05	104
T. cutaneum 5	20.3±1.2	100	121.0±3.2	114	14.5±0.9	100	7.1±0.07	157
Trametes versicolor	7.6±0.5	144	22.0±1.0	150	20.8±1.1	134	3.4±0.05	163
Sporotrichum pulverulentum 1767	7.6±0.6	144	21.0±0.9	143	32.6±1.0	210	3.9±0.03	185
Streptomyces asterosporus	16.0±1.0	80	82.0±2.4	74	13.7±0.9	93	6.6±0.09	140
Penicillum citreo-viride	17.2±1.1	86	112.0±3.0	100	18.2±1.0	124	7.7±0.05	163
Acremonium sp.	16.0±0.9	80	91.0±2.4	91	13.5±0.9	92	5.4±0.05	109
Phanerochaete chrysosporium ATCC 24725	7.6 ±0.5	145	19.9±0.4	135	22.0±1.1	142	3.0±0.02	140
*Phanerochaete chrysosporium*1 MR-1	19.7±0.9	100	94.0±2.5	88	13.7±0.8	93	4.0±0.02	88
Гетероауксин	21.9±0.9	109	121.0±3.2	114	17.5±1.0	119	4.7±0.04	105
Гиббереллин	25.5±1.0	127	88.0±2.5	82	17.8±1.1	121	3.8±0.02	85
Глутамин	не опр.		не опр.		14.6±1.0	100	3.7±0.05	82
Глицин	не опр.		не опр.		21.5±1.1	146	5.1±0.06	114
Аланин	не опр.		не опр.		23.1±1.0	157	5.6±0.05	125
Валин	не опр.		не опр.		19.1±1.1	130	3.6±0.06	81
Смесь аминокислот	не опр.		не опр.		17.6±0.9	120	3.4±0.08	75
Контроль	20.1±1.0	100	107.0±3.0	100	14.7±0.9	100	4.5±0.05	100

Таблица 4.4.3 - Влияние предпосевной обработки семян культуральными фильтратами на рост гороха

Микроорганизм	Росток				Корень			
	длина		масса		длина		масса	
	см	%	мг	%	см	%	мг	%
Trichosporon cutaneum D-46	6.2±0.5	148	227.3±15.1	258	9.6±0.3	270	27.3±1.8	270
T. cutaneum 5	11.0±0.9	263	248.7±15.6	282	8.4±0.5	237	24.7±1.0	245
Trametes versicolor	6.9±0.5	165	227.3±15.0	258	9.5±0.2	269	27.3±1.8	270
*Sporotrichum pulverulentum*1767	10.6±0.9	249	194.7±10.9	221	9.3±0.3	261	20.1±0.9	199
Penicillum citreo-viride	6.1±0.7	146	129.5±15.0	147	7.6±0.3	214	15.8±0.8	156
Acremonium sp.	4.7±0.2	112	148.9±11.4	169	5.8±0.6	163	16.2±0.8	160
Phanerochaete chrysosporium ATCC 24725	6.6±0.5	158	121.5±9.0	138	4.1±0.2	115	11.4±0.4	112
Phanerochaete chrysosporium 1 MR-1	6.9±0.7	165	256.4±16.0	291	6.3±0.4	178	26.5±1.1	262
Гетероауксин	7.5±0.7	178	167.4±16.9	190	6.4±0.5	180	20.2±0.9	200
Гиббереллин	9.3±0.9	223	124.2±10.2	141	9.4±0.9	266	19.3±1.0	191
Контроль	4.2±0.2	100	88.1±9.6	100	3.6±0.2	100	10.1±0.5	100

Таблица 4.4.4 - Влияние предпосевной обработки семян культуральными фильтратами на рост кукурузы

Микроорганизм	Росток				Корень			
	длина		масса		длина		масса	
	см	%	мг	%	см	%	мг	%
Trichosporon cutaneum D-46	8.2±0.5	48	78.1±5.0	45	13.2±0.8	73	10.4±0.1	55
T. cutaneum 5	12.5±0.9	73	134.0±7.4	77	16.3±1.1	90	24.4±0.4	128
Streptomyces asterosporus	10.4±0.6	61	130.2±7.0	75	15.7±1.0	86	16.4±0.1	86
Penicillum citreo-viride	10.1±0.5	59	85.1±5.4	49	10.4±0.5	57	9.4±0.06	50
Acremonium sp.	9.2±0.5	54	73.3±5.0	42	12.5±0.8	69	10.0±0.1	53
Phanerochaete chrysosporium	11.4±0.9	66	91.1±5.8	59	11.9±0.7	65	6.7±0.05	35
Гетероауксин	10.0±0.6	58	66.0±3.8	38	12.6±0.7	69	17.9±0.4	94
Гиббереллин	10.7±0.5	62	97.1±6.0	56	14.2±0.9	78	20.7±0.5	109
Контроль	17.2±0.5	100	173.3±7.9	100	18.2±1.1	100	19.0±0.4	100

Для сравнения действия синтезируемых грибами веществ, аналогичных фитогормонам растений, с коммерческими фитогормонами в рекомендованной концентрации было исследовано действие последних. Эксперимент (таблицы 4.4.1-4.4.4, рисунок 4.4.1) показал, что гетероауксин достоверно стимулирует развитие проростков пшеницы и гороха. Влияние гиббереллина было однозначно положительным только на горох. В отношении пшеницы наблюдалось отрицательное воздействие на массу, как корней, так и ростков. Изменение ростовых характеристик ячменя было не всегда значимым, хотя динамика была такая же, как у пшеницы. Разницу в действии гиббереллина можно объяснить тем, что двудольные и однодольные растения неодинаково реагируют на одни и те же концентрации фитогормонов [435].

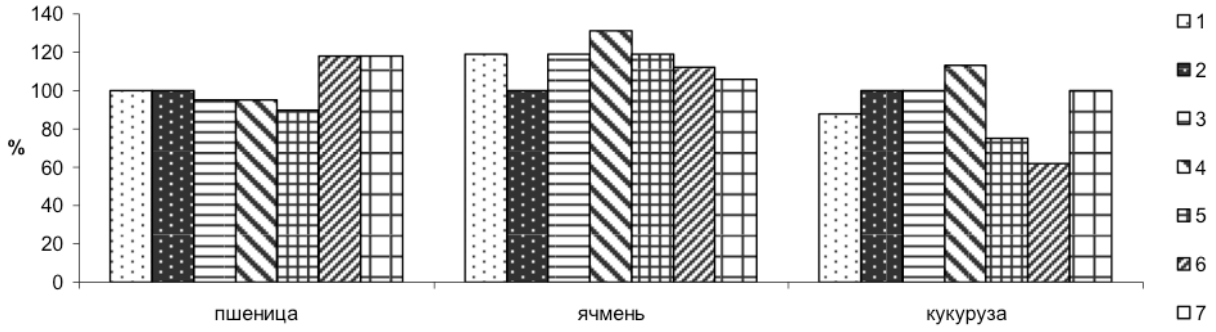


Рисунок 4.4.1 - Всхожесть семян (% от контроля), обработанных культуральными фильтратами и фитогормонами. 1 - *Trichosporon cutaneum* шт. D-46, 2 - *Trichosporon cutaneum* шт. 5, 3 - *Streptomyces asterosporus*, 4 - *Penicillum citreo-viride*, 5 - *Acremonium* sp., 6 – гетероауксин, 7 – гиббереллин

Таким образом, установлено, что культуральные фильтраты исследованных лигнинолитических микроорганизмов стимулируют развитие ячменя и пшеницы благодаря присутствию в них биологически активных веществ, влияющих на метаболические процессы в семенах растений. Основной эффект направлен на увеличение количества боковых корней.

4.5 Антагонистическое действие микроорганизмов

Практически все актиномицеты, многие грибы и бактерии способны образовывать вещества, подавляющие рост других микроорганизмов [235, 436, 437], 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 (таблица 4.5.1).

Таблица 4.5.1 - Антибиотическая активность исследуемых микроорганизмов

Микроорганизм	Диаметр зоны подавления роста, мм			
	B. subtilis	*E. durans*	*P. aeruginosa*	*E. coli*
T. cutaneum D-46	11±0.2	2±0.1	15±0.2	11±0.2
T. cutaneum 5	10±0.2	1±0.1	17±0.2	11±0.1
Trametes versicolor	1±0.1	0	6±0.1	1±0.1
Ph. chrysosporium ATCC 24725	0	0	6±0.1	0
Ph. chrysosporium 1 MR-1	0	6±0.1	5±0.1	0
S. pulverulentum 1767	13±0.1	7±0.2	7±0.1	13±0.5
P. citreo-viride	0	0	0	1±0.1
Acremonium sp.	13±0.2	11±0.2	5±0.1	2±0.1
P. oryzihabitans 102	не опр.	не опр.	не опр.	не опр.
A. guillouiae 112	2±0.1	6±0.2	7±0.1	11±0.2
R. erythropolis 108	8±0.1	12±0.3	13±0.1	14±0.9
A. guillouiae 114	2±0.1	8±0.2	7±0.1	11±0.3
Pseudomonas sp. 109	не опр.	не опр.	не опр.	не опр.
P. corrugate 90	не опр.	не опр.	не опр.	не опр.

Наиболее активными оказались штаммы *R. erythropolis* 108 и *S. pulverulentum* 1767, эффективно подавляющие рост всех исследованных

культур. Высокой антибиотической способностью характеризовались также оба штамма *T. cutaneum*. Интересно, что *P. citreo-viride* активность практически не проявляет.

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

Нами была исследована активность грибов по отношению к возбудителю заболевания картофеля *Fusarium orthoceras*. Обнаружено, что антагонистической активностью обладают грибы *S. pulverulentum* (оба штамма), *P. chrysosporium* (оба штамма), *Trametes versicolor*. Максимальную активность проявляет *S. pulverulentum* 1767 (рисунок 4.5.1, таблица 4.5.2).

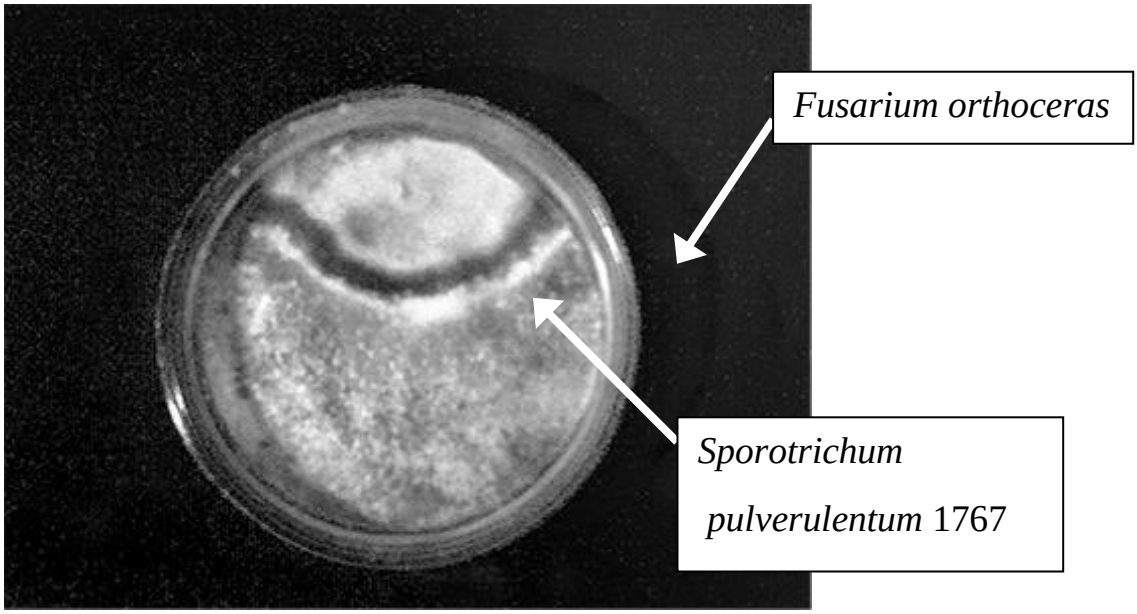


Рисунок 4.5.1 - Антагонистическая активность *Sporotrichum pulverulentum* 1767.

Фунгицидная активность немаловажна для компоста, т. к. в почве, как правило, присутствуют фитопатогенные грибы, и наличие в удобрении культур, обладающих антифунгальным действием и при этом не подавляющих друг друга, позволит улучшить санитарное состояние почвы и снизить заболеваемость растений, что, в конечном счете, повысит качество урожая сельскохозяйственной продукции.

Таблица 4.5.2 - Фунгицидная активность исследованных культур

Микроорганизм	Диаметр зоны подавления роста гриба, мм
Sporotrichum pulverulentum 1766	8±0.5
S. pulverulentum 1767	11±0.5
Acremonium sp.	-
Phanerochaete chrysosporium 1 MR-1	7±0.7
P. chrysosporium ATCC 24725	3±0.2
Trametes versicolor	6±0.5

Влияние микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности на интактную почву заключается не только в подавлении роста патогенных культур, но и в создании новых сукцессий, стимулируемых внеклеточными метаболитами внесенных культур, а также в изменении суммарной активности почвенных ферментов. Влияние культуральных фильтратов на количество микроорганизмов почвы (таблица 4.5.3) имело четко выраженную зависимость от типа воздействующего организма. Так, культуральный фильтрат грибов достоверно увеличивал численность почвенных бактерий и актиномицетов. Это связано с тем, что в ростовых процессах грибы выделяют большое количество биологически активных веществ (органические кислоты, витамины, мочевина, углеводы и др.), способствующих активизации микрофлоры. Наиболее эффективным оказался *P. citreo-viride* [438].

Таблица 4.5.3 - Влияние культуральных фильтратов на количество микроорганизмов и ферментов почвы (% от контроля)

	Trichosporon cutaneum			*Streptomyces asterosporus*		Грибы		
	Контроль (питательная среда)	*T. cutaneum* D-46	*T. cutaneum* 5	Контроль (питательная среда)		Контроль (питательная среда)	*Acremonium* sp.	*Penicillum citreo-viride*
Бактерии	$2.2 \cdot 10^6 \pm 0.6 \cdot 10^6$	$2.9 \cdot 10^6 \pm 0.6 \cdot 10^6$	$23 \cdot 10^6 \pm 3.0 \cdot 10^6$	$16.5 \cdot 10^6 \pm 0.5 \cdot 10^6$	$15.5 \cdot 10^6 \pm 0.5 \cdot 10^6$	$1.8 \cdot 10^6 \pm 0.5 \cdot 10^6$	$7.5 \cdot 10^6 \pm 1.1 \cdot 10^6$	$14.4 \cdot 10^6 \pm 1.4 \cdot 10^6$
Грибы	$6.0 \cdot 10^4 \pm 0.6 \cdot 10^4$	$8.0 \cdot 10^4 \pm 0.4 \cdot 10^4$	$7.0 \cdot 10^4 \pm 0.5 \cdot 10^4$	$6.6 \cdot 10^4 \pm 0.9 \cdot 10^4$	$16.0 \cdot 10^4 \pm 0.6 \cdot 10^4$	$10.0 \cdot 10^4 \pm 1.5 \cdot 10^4$	$2.5 \cdot 10^4 \pm 0.5 \cdot 10^4$	$4.3 \cdot 10^4 \pm 0.9 \cdot 10^4$
Актиномицеты	$3.2 \cdot 10^6 \pm 0.4 \cdot 10^6$	$3.1 \cdot 10^6 \pm 0.6 \cdot 10^6$	$4.9 \cdot 10^6 \pm 0.8 \cdot 10^6$	$9.0 \cdot 10^6 \pm 0.1 \cdot 10^6$	$9.8 \cdot 10^6 \pm 1.3 \cdot 10^6$	$4.3 \cdot 10^6 \pm 0.7 \cdot 10^6$	$8.5 \cdot 10^6 \pm 0.1 \cdot 10^6$	$26 \cdot 10^6 \pm 2.0 \cdot 10^6$
Аэробные целлюлозолитики	$10.0 \cdot 10^4 \pm 1.2 \cdot 10^4$	$9.8 \cdot 10^4 \pm 1.6 \cdot 10^4$	$6.6 \cdot 10^4 \pm 1.3 \cdot 10^4$	$8.5 \cdot 10^4 \pm 1.5 \cdot 10^4$	$8.3 \cdot 10^4 \pm 1.5 \cdot 10^4$	$10.3 \cdot 10^4 \pm 1.7 \cdot 10^4$	$9.0 \cdot 10^4 \pm 1.2 \cdot 10^4$	$7.8 \cdot 10^4 \pm 1.3 \cdot 10^4$
Полифенолоксидазы, мкмоль/мл·мин	0.095	0.057	0.056	0.131	0.118	0.026	0.059	0.029
Инвертаза, мг/г почвы	3.00	3.10	2.91	2.33	2.34	2.70	3.10	3.30
Целлюлаза, мг/г почвы	0.05	0.05	0.07	0.09	0.10	0.03	0.02	0.03

Действие актиномицета *S. asterosporus* проявлялось исключительно в увеличении численности грибов. Это понятно, если учесть, что бактерии этого рода, как правило, являются продуцентами антибиотиков, лишь немногие из которых ингибируют рост грибов. Культуральные фильтраты дрожжеподобных грибов положительно влияли на количество всех трех основных групп микроорганизмов. Количество аэробных целлюлозолитиков практически не отличалось от контроля. ПФО- и инвертазная активности почвы не зависели от внесения культуральных фильтратов (таблица 4.5.3).

Таким образом, нами установлено, что исследованные микроорганизмы выделяют в культуральную жидкость разнообразные биологически активные вещества, что обусловливает их высокую активность при трансформации органических субстратов. 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 биологически активных веществ обеспечивает исследованным штаммам преимущества среди почвенной микрофлоры как активным деструкторам органических субстратов и фитозащитным микроорганизмам.

5. Микробная трансформация субстратов как способ восстановления почвенных экосистем

Промышленное использование микробных препаратов для трансформации различных субстратов невозможно без понимания протекающих при этом процессов. В это время формируется сукцессия микроорганизмов, характерная только для конкретных субстратов, происходят активные изменения в химическом и ферментативном спектре субстрата, его дыхании и фитотоксичности [439-441]. Для целенаправленного управления процессами и получения конечного продукта с прогнозируемыми свойствами необходимо изучение динамики их физико-химических, биохимических и микробиологических параметров. Нами проведены детальные исследования развития микробной сукцессии и ферментативных процессов, протекающих в ходе микробиологической трансформации ГЛ и опилок, а также оценен вклад микроорганизмов-нефтедеструкторов в восстановление почвенного гомеостаза нефтезагрязненных почв.

5.1 Изменение физико-химических параметров субстратов при микробном воздействии

Динамика температуры является одним из основных параметров, анализируемых при микробиологической переработке лигноцеллюлозных субстратов [442]. Это характерно как для простого компостирования навоза [443] и куриного помета [444], так и с внесением коммерческих препаратов [444]. Повышением температуры сопровождаются процессы, происходящие с участием личинок мух [445] и красных калифорнийских червей [446]. Более того, отсутствие подъема температуры свидетельствует об отсутствии ферментации и аномальности протекания процесса [85].

Наши исследования проводились в ходе полупромышленного эксперимента на 5 т свежего гидролизного лигнина и параллельно в нескольких вариантах полупромышленного компостирования свежих опилок (в работе были использованы различные смеси опилок лиственных и хвойных пород древесины в различных регионах России). Хорошая корреляция результатов позволяет говорить о схожести процессов, несмотря на различия в субстратах. Скорость подъема температуры в центральной части компостного бурта зависела от температуры окружающего воздуха и колебалась в диапазоне 3-10 дней (рисунки 5.1.1-5.1.3). Затем температура плавно снижалась в течение 2-3 недель, свидетельствуя о снижении интенсивности микробиологических процессов и недостатке кислорода. Следующие подъемы наблюдались только после перемешивания, которое проводилось через 3-4, 7-8, 10-12 нед. после начала компостирования. Отсутствие температурной реакции компоста на перемешивание указывало на окончание ферментации. Различные слои компоста характеризовались значительными колебаниями температуры. Максимальных значений она достигала в центральной части бурта (глубина более 40 см) – до 60-65 ^{0}С. Поверхностные и нижние слои прогревались значительно хуже вследствие потерь тепла от его рассеяния или недостаточного поступления кислорода из-за спрессовывания компостируемой смеси. В целом динамика температуры свидетельствовала об активности протекающих микробиологических процессов. В контрольном эксперименте (без внесения микроорганизмов) подъема температуры субстрата за все время измерения не наблюдалось, а динамика температур практически не отличалась от температурных показателей для почвы и воздуха. Такой же эффект характерен для небольших объемов субстрата – снижение массы субстрата до 1-2 т полностью исключает его разогрев.

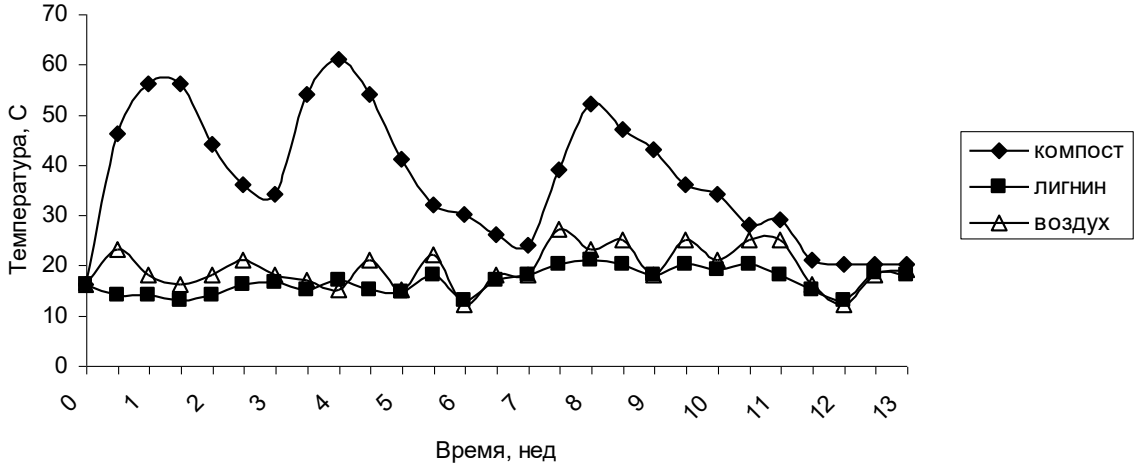


Рисунок 5.1.1 - Изменение температуры в процессе компостирования лигнина

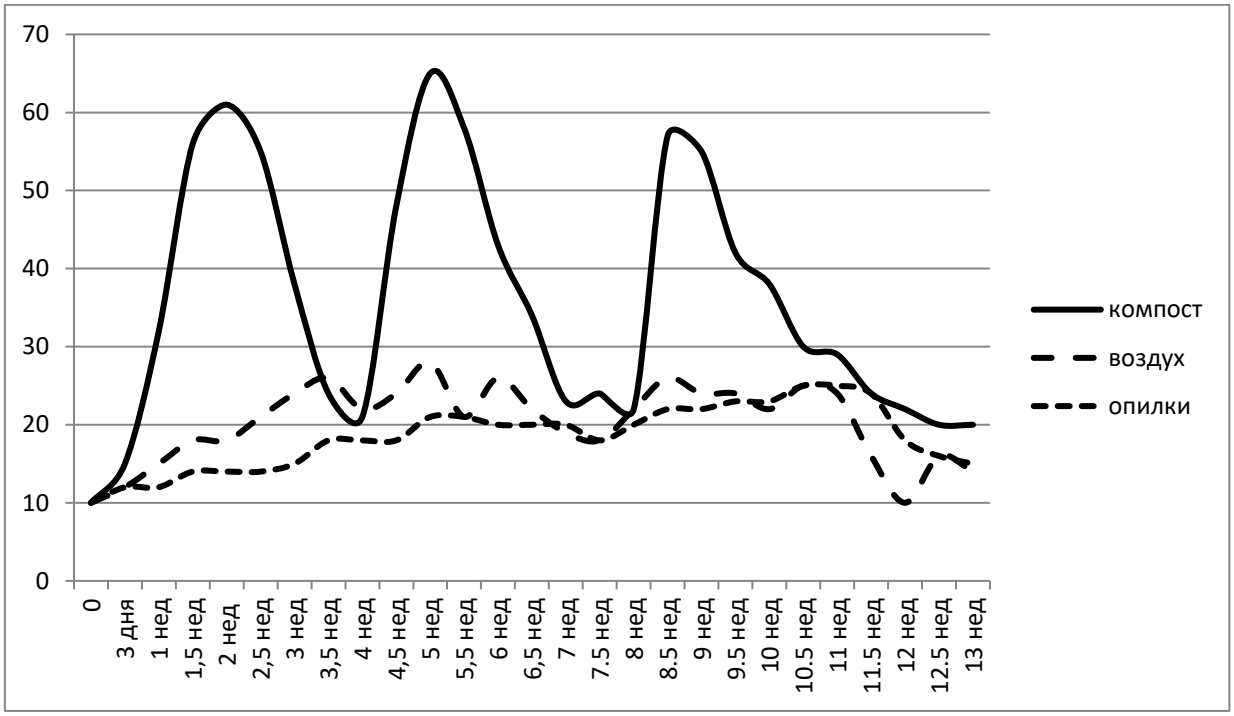


Рисунок 5.1.2 - Изменение температуры в процессе компостирования опилок

Рисунок 5.1.3 - Внешний вид компостируемых опилок при повышении температуры

Еще одним важным для микробиологической деструкции параметром является кислотность субстрата (pH). Особенности технологии гидролиза древесины, отходом которой служит ГЛ, обусловливают его высокую кислотность (pH 2.0-2.5), поэтому перед внесением микроорганизмов его необходимо нейтрализовать. Кислотность опилок выше (pH 5.0-5,5), однако, при хранении они способны спонтанно раскисляться со снижением pH до 3.5-4.0, что тоже требует нейтрализации. В качестве подщелачивающего агента в разных случаях использовались гашеная известь, доломитовая мука или аммиачная вода. Через неделю после внесения нейтрализатора pH устанавливался на уровне 6.0-7.0 независимо от субстрата и присутствия микроорганизмов, сохраняясь таковым на протяжении всего опыта (таблицы 5.1.1-5.1.3). Различия значений pH солевой и водной вытяжки были незначительными. Стабильность оказалась характерной и для контроля (бурты без внесения микроорганизмов), что связано либо с отсутствием влияния внесенной микрофлоры, либо с установлением в нашем опыте оптимального для ферментации лигноцеллюлозных остатков значения pH.

Таблица 5.1.1 – Физико-химические и агрохимические показатели гидролизного лигнина и компоста на его основе

Срок компостирования	Зола, %	pH_{KCl}	Гуминовые кислоты, %	Валовое содержание, %			Подвижные формы, мг/100 г		
				N	P_2O_5	K_2O	$N\text{-}NO_3$	$N\text{-}NH_4$	P_2O_5
ГЛ	9.0	2.5	6.2	следы	0.4	0.2	0.9	12	40
ГЛ+минеральные добавки	20.4	8.6	6.2	3.7	1.3	1.1	2.5	1020	700
Компост 4 нед.	12.6	6.2	7.8	2.2	2.2	2.2	148	750	1000
Компост 8 нед.	14.7	6.0	9.1	1.5	1.9	1.8	208	920	1150
Компост 12 нед.	12.5	6.2	10.2	1.6	2.0	1.8	293	980	1200
Контроль* 4 нед.	16.2	5.9	8.3	2.5	1.3	Не опр.	154	1200	1050
Контроль* 8 нед.	13.6	6.0	8.3	2.2	1.3	Не опр.	173	980	900
Контроль* 12 нед.	10.5	5.7	8.1	2.9	1.2	Не опр.	111	1950	800

*Нейтрализованный ГЛ с минеральными добавками, но без внесения микроорганизмов

Таблица 5.1.2 - Физико-химические и агрохимические показатели опилок и компоста на их основе

Срок компостирования	Зола, %	pH_{KCl}	Гуминовые кислоты, %	Валовое содержание, %			Подвижные формы, мг/100 г		
				N	P_2O_5	K_2O	$N\text{-}NO_3$	$N\text{-}NH_4$	P_2O_5
опилки	2.9	4.2	0	0.18	0	0	0	0	0
опилки+минеральные добавки	21.8	8.6	0	2.7	1.0	0.7	0	1080	700
Компост 4 нед.	21.6	6.5	7.4	2.3	0.2	0.5	110	750	920
Компост 8 нед.	21.4	6.2	8.1	1.5	0.22	0.3	135	480	1110
Компост 12 нед.	20.7	6.4	11.2	1.8	0.22	0.5	140	500	1200
Контроль* 4 нед.	21.8	3.8	1.2	2.9	1.2	Не опр.	66	1200	790
Контроль* 8 нед.	21.2	5.6	3.8	2.8	1.2	Не опр.	76	1100	710
Контроль*12 нед.	20.9	5.9	5.3	2.8	1.0	Не опр.	90	1150	680

*Нейтрализованные опилки с минеральными добавками, но без внесения микроорганизмов

Таблица 5.1.3 - Качественный и количественный состав компостов на основе опилок

Наименование показателя, ед. измерения	Опилки[1]	Компост 1 (осина)	Компост 2 (сосна/ лиственница)	Компост 3 (лиственница)	Компост 4 (сосна/ ель)	Верховой торф[2]
Внешний вид	Структурированная масса светло-желтого цвета	Порошок темно-коричневого цвета с примесью древесных опилок	Рассыпчатая масса коричневого цвета с вкраплениями структурированных опилок	Рассыпчатая масса коричневого цвета с вкраплениями структурированных опилок	Рассыпчатая масса коричневого цвета с вкраплениями структурированных опилок	Рассыпчатая масса с насыщенным черным, либо черным с коричневым оттенком цветом
Массовая доля органического вещества, %	82	44.6	61.8	53.8	66.1	72-94
Емкость катионного обмена, мг*экв/100 г	1.2	8.98	10.25	9.11	10.75	10-12
Гидролитическая кислотность, мг*экв/100 г	7.3	1.14	1.14	1.17	1.12	5-10
Сумма поглощенных оснований, мг*экв/100 г	16.2	31.5	31.8	35.6	37.6	60-90
pH водный	4.5	6,2	7.2	6.9	7.7	2.5-3.5
pH солевой	4.2	6.4	6.8	6.5	7.2	3-3.9
Массовая доля гуминовых кислот в пересчете на сухое вещество, %	0	5.3	11.3	9.2	9.4	9-14
Массовая доля золы, %	2.9	20.7	20.1	18.5	12.55	2-12

Продолжение таблицы 5.1.3

Наименование показателя, ед. измерения	Опилки[1]	Компост 1 (осина)	Компост 2 (сосна/ лиственница)	Компост 3 (лиственница)	Компост 4 (сосна/ ель)	Верховой торф[2]
Массовая доля общего азота (N) в пересчете на сухое вещество, %	0.18	1.62	2.22	1.87	1.65	0.7-1.35
Содержание аммиачного азота ($N\text{-}NH_4$), мг/100 г	0	500	1200	800	250	5-20
Содержание нитратного азота ($N\text{-}NO_3$), мг/100 г	0	140	150	140	20	Не опр.
Массовая доля фосфора (P_2O_5) в пересчете на сухое вещество, %	0	0.22	0.28	0.24	0,44	0.1-0.3
Содержание подвижных форм фосфора (P_2O_5), мг/100 г	0	1200	1250	1300	1500	Не опр.
Массовая доля калия (K_2O) в пересчете на сухое вещество, %	0	0.5	0.4	0.45	0,4	0.01-0.24
Содержание подвижных форм калия (K_2O), мг/100 г	0	1000	1000	1000	1000	Не опр.
Соотношение C : N	19.7	6.8	6.2	8.4	8.7	24.1

1-среднее по всем типам опилок

2- литературные данные [447]

5.2 Изменение агрохимических показателей лигноцеллюлозных субстратов в процессе переработки

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 (см. таблицу 5.1.3). При высокой доле органического вещества, процент золы составляет всего 2-9 %, что обусловливает высокое соотношение C/N. Свежие опилки обладают низкой емкостью катионного обмена и не способны эффективно поглощать основания, однако имеют высокую гидролитическую кислотность. Для интенсификации микробных процессов в начале компостирования были добавлены минеральные компоненты. Увеличение общего количества азота, фосфора и калия, вызванное внесением минеральных добавок, нивелировалось деятельностью микроорганизмов (см. таблицу 5.2.1- 5.2.2), что хорошо согласуется с литературными данными [448] и предыдущими экспериментами [449]. Это вызвано активным размножением микроорганизмов. Постепенное увеличение общего азота к концу компостирования свидетельствует о деятельности азотфиксаторов, т.к. при компостировании без внесения микроорганизмов роста содержания общего азота к концу компостирования не наблюдалось.

Таким образом, к концу компостирования в субстрате увеличивается общее количество легкодоступных форм азота, что должно положительно сказаться на повышении урожайности. Подобные результаты получены в работе [450] при использовании в качестве субстрата осадков сточных вод. В контрольном опыте снижение общего азота незначительнее из-за менее активного размножения микроорганизмов и их малого разнообразия.

В основе синтеза гумусовых компонентов как почвы, так и органического удобрения, лежат окислительно-восстановительные процессы,

в которых участвуют соответствующие ферменты [451]. Фенольные соединения растительных остатков ферментативно окисляются с образованием феноксильных радикалов, конденсирующихся затем с аминокислотами и пептидами, в результате чего синтезируются молекулы гуминовых кислот. Плавное увеличение содержания ГК, отмечаемое в течение практически всего срока компостирования (до 10 недель), обусловливается высокой активностью оксидазных ферментов. Наблюдаемое в последние недели компостирования повышение содержания ГК на фоне очень низкой активности оксидоредуктаз в компосте связано, по-видимому, с преобладанием неферментативной конденсации образовавшихся окисленных продуктов.

Общее количество ГК в контроле повышалось только в первые недели компостирования. Это может быть следствием бурного развития в этот период актиномицетов [452]. Далее концентрация ГК не имела тенденции к увеличению, заметно даже небольшое ее снижение к двенадцатой неделе опыта.

Емкость катионного обмена определяли только для опилочных компостов [453]. Показано, что она возрастает до уровня таковой для верхового торфа, а гидролитическая кислотность оказывается существенно ниже (см. таблицу 5.1.3). Данные показатели очень важны для сохранения почвенного гомеостаза [454], т.к. внесение удобрения будет стабилизировать вымывание оснований из почв сельскохозяйственного назначения. Это особенно важно для бедных дерново-подзолистых и серых лесных почв. Так, показано, что при увеличении емкости поглощения почвы за счет внесения сорбентов-ионообменников вымывание веществ в дерново-подзолистых почвах Северо-Западного региона снижается в среднем в 1,5-3 раза [455].

Интересно, что варьирование вида древесных опилок, места и времени проведения компостирования практически не влияют на агрохимические показатели готового продукта (см. таблицу 5.1.2, 5.1.3). Резкое снижение количества подвижного азота в образце компоста 4 связано с меньшей дозой

минеральных добавок, внесенных в начале компостирования. Ранее нами было показано [456], что применение стандартных количеств минеральных добавок приводит к излишнему накоплению в готовом компосте нитратов, поэтому в дальнейших экспериментах использовалась меньшая их дозировка. Совпадение по многим показателям с верховым торфом позволяет сделать вывод о высоком качестве готового продукта, а значительно большее количество подвижных форм биогенных элементов и оптимальный pH позволит использовать опилочный компост без внесения дополнительных питательных веществ (см. таблицу 5.1.3).

Таким образом, установлено, что в процессе трансформации органических субстратов изменяются их основные агрохимические характеристики. Полученное удобрение, независимо от состава субстрата, времени и места компостирования стабильно по составу и основным агрохимическим показателям. Удобрение содержит азот, фосфор, калий в легко усваиваемой растениями форме и в хорошо сбалансированном виде. Эти вещества, а также гуминовые кислоты, входящие в состав удобрения, будут обеспечивать эффективный рост и развитие растений в течение вегетационного периода. Готовый продукт по основным агрохимическим показателям сопоставим с верховым торфом, но превосходит его по содержанию подвижных форм основных биогенных элементов.

5.3 Изменение биологических параметров субстратов и почвы при микробном воздействии

5.3.1 Изменение количества микроорганизмов в трансформируемом субстрате

В связи с тем, что в работе использовались нестерильные субстраты, в которые вносились различные микроорганизмы, необходимо было исследовать динамику численности их основных групп, а, в случае

гидролизного лигнина, еще и целевых деструкторов. Динамика численности микроорганизмов при компостировании опилок не исследовалась.

На первых этапах переработки ГЛ в присутствии «закваски» выявлялись микроорганизмы практически всех исследованных физиологических групп (рисунок 5.3.1.1). Лишь увеличение численности нитрификаторов происходило постепенно.

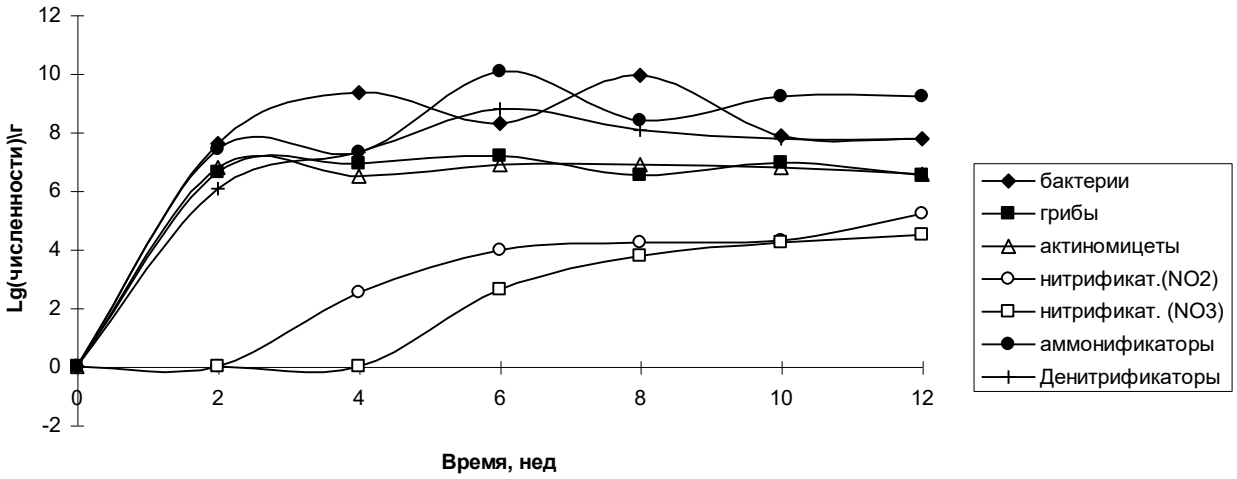


Рисунок 5.3.1.1 - Изменение количества микроорганизмов в процессе компостирования гидролизного лигнина (начальная численность определялась в ГЛ до внесения закваски).

Интересна динамика численности аэробных целлюлозолитиков и термофилов. Максимумы их количества коррелировали с максимумами температуры (рисунок 5.3.1.2) в отличие от других групп микроорганизмов (рисунок 5.3.1.1). Совпадение на 6-12 нед. компостирования динамики численности бактерий с динамикой численности термофилов дает основание предполагать, что они представлены преимущественно бактериями. Общее количество микроорганизмов стабилизировалось к 3 мес. компостирования, оставаясь на достаточно высоком уровне. Таким образом, к окончанию компостирования создалось устойчивое микробное сообщество, что характерно для готового компоста [439, 457].

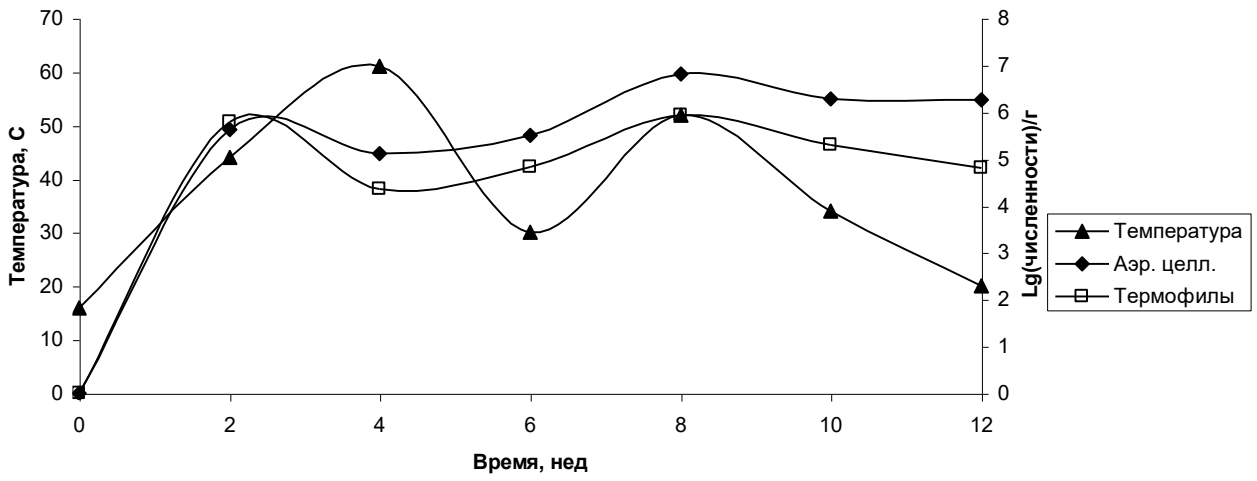


Рисунок 5.3.1.2 - Динамика количества термофилов и аэробных целлюлозолитиков в процессе компостирования гидролизного лигнина.

В тоже время, количество микроорганизмов в контрольном эксперименте было существенно ниже, чем в опытном (рисунок 5.3.1.3).

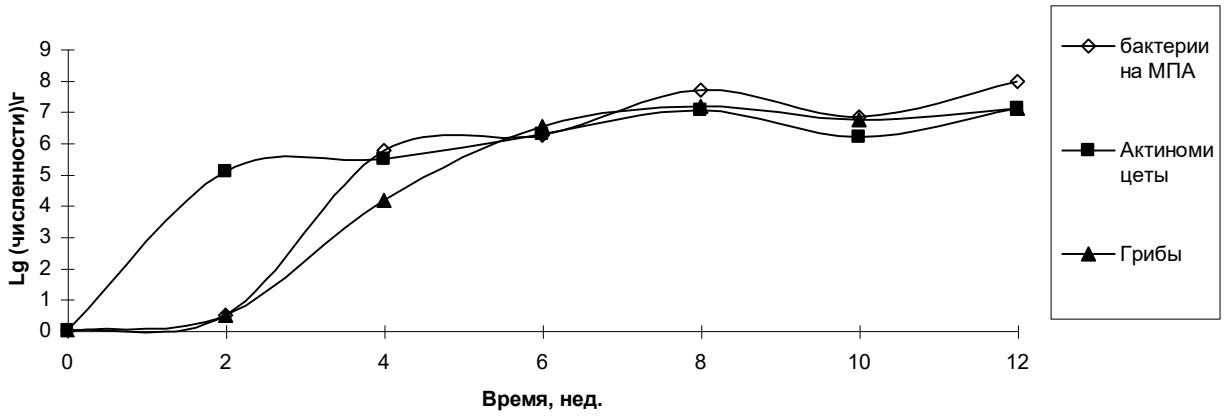


Рисунок 5.3.1.3 - Изменение количества микроорганизмов в контрольном опыте.

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. Эти данные противоречат результатам Е. Л. Имрановой [439], показавшей, что актиномицеты преобладают в деградационной сукцессии лишь на финальных стадиях. В

данном случае возможным смещением пика активности актиномицетов может служить нейтрализация субстрата перед переработкой.

В случае применения бактерий-нефтедеструкторов мы исследовали почву, как интактную, так и искусственно загрязненную нефтью. Выявлено, что структура микробного сообщества в незагрязнённой почве представлена большей частью бактериями (рисунок 5.3.1.4).

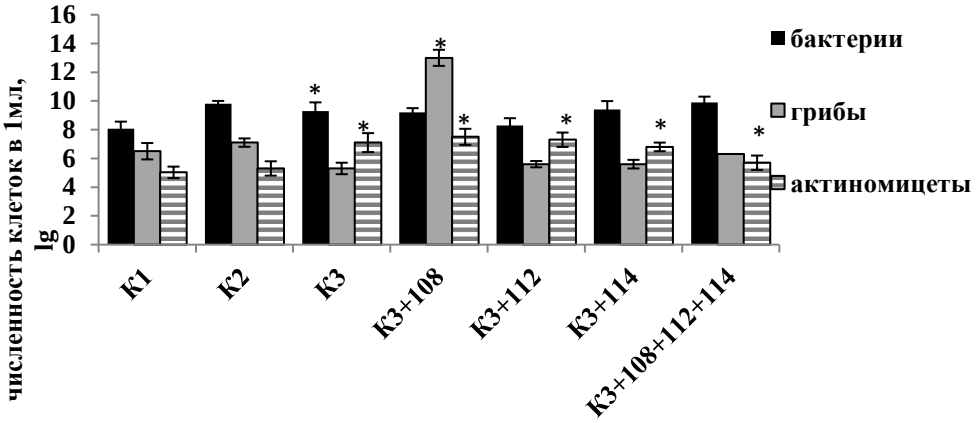


Рисунок 5.3.1.4 - Исследование микробного спектра почвы: К1 - незагрязнённая почва; К2 - загрязнённая нефтью почва (через 5 сут.), К3 - загрязненная почва (через 60 сут.) без бактерий, К3+108 - загрязненная почва+штамм *R. Erythropolis* 108, К3+112 - загрязненная почва+штамм *A. guillouiae* 112, К3+114 - загрязненная почва штамм *A. guillouiae* 114, К3+108+112+114 - загрязненная почва+консорциум *R. erythropolis*+*A. guillouiae*112+*A.guillouiae*114

Примечание: звездочкой показаны достоверные различия показателя от контроля 2, при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Загрязнение почвы нефтью привело к значимому ($p \leq 0,05$) увеличению всех исследованных групп микроорганизмов уже через пять суток после внесения. Через два месяца численность гетеротрофных бактерий и грибов достоверно снижалась, тогда, как количество актиномицетов возрастало, что согласуется с данными Е. А. Полянсковой [458]. Существенные перестройки в структуре почвенного сообщества могут свидетельствовать о переходе в зону стресса [459, 460].

Согласно полученным результатам, внесение нефти в почву способствует 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, связанных преимущественно со стимулированием роста бактерий. Тот факт, что при добавлении консорциума микроорганизмов структура микробного сообщества практически не отличалась от незагрязненной почвы, свидетельствует о восстановлении почвенных популяций.

5.3.2 Ферментативная активность трансформируемых субстратов и почвы при микробном воздействии

Учет численности микроорганизмов дает наиболее полную информацию о происходящих при трансформации субстратов изменениях, но этот анализ очень трудоемок. Косвенным свидетельством присутствия тех или иных микроорганизмов может служить наличие продуцируемых ими ферментов. Ферментативная активность является одним из важнейших критериев протекающих микробиологических процессов. Особенности используемых в работе субстратов, а также видов микроорганизмов побудили нас отказаться от определения большинства рекомендуемых для энзимоиндикации ферментов и использовать собственные энзиматические маркеры [461, 462], в качестве которых был выбран ряд оксидоредуктазных ферментов (каталаза, пероксидаза, полифенолоксидаза (ПФО), а также ферментов, принимающих участие в метаболизме азотсодержащих соединений (уреаза) и углеводов (инвертаза, целлюлаза) [393].

Микробиологическая переработка ГЛ приводила в повышению активности всех оксидоредуктаз уже на второй неделе ферментации (рисунок 5.3.2.1, А, Б). Уровень оксидазной активности коррелировал с изменением

температурного режима компостирования. По мере созревания компоста (к трем месяцам обработки) активность ферментов этого класса снижалась почти до нуля. Подобные результаты были получены и для динамики компоста, инокулированного *Pleurotus sajor-caju*, для которого пик активности лакказы наблюдался через два месяца компостирования, с полным ее исчезновением к концу процесса [463].

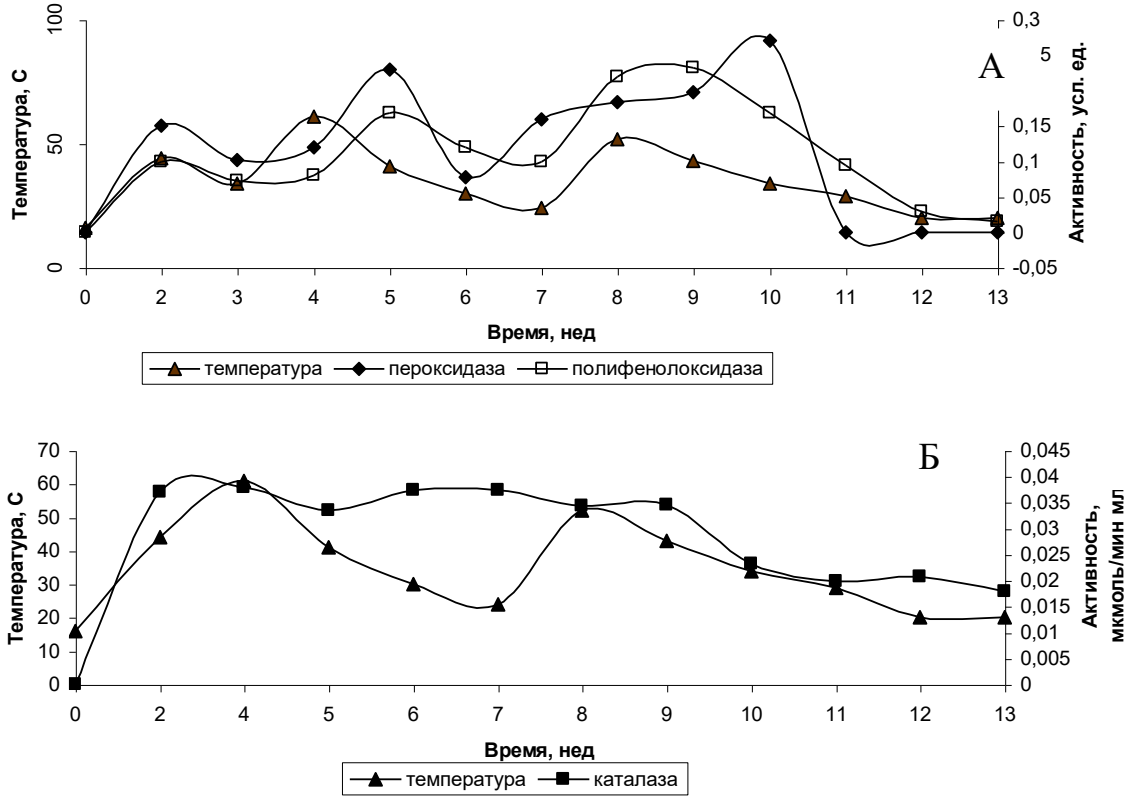
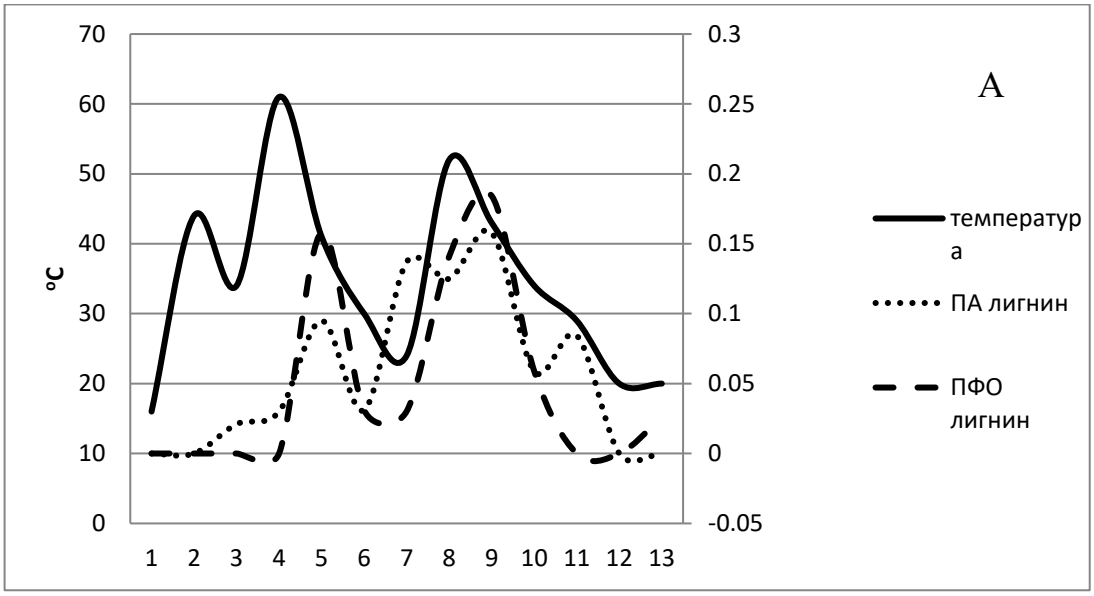


Рисунок 5.3.2.1 - Изменение активности оксидоредуктаз: А – пероксидазы и полифенолоксидазы; Б – каталазы в процессе компостирования гидролизного лигнина.

Иначе происходило изменение активности ферментов в контроле (рисунок 5.3.2.2). ПФО-активность появилась только к 6 нед. наблюдения, и динамика ее в дальнейшем полностью соответствовала таковой в опытном бурте, но с меньшими значениями активности.



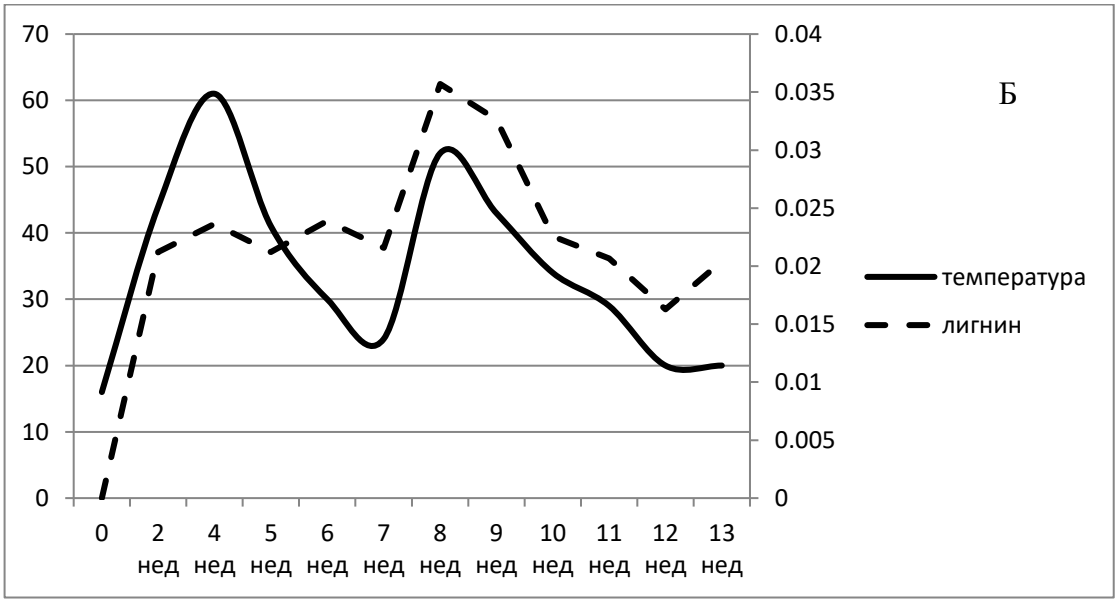


Рисунок 5.3.2.2 - Изменение активности оксидоредуктаз в контрольном бурте: А – пероксидазы и полифенолоксидазы; Б – каталазы.

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. Наличие пероксидазной активности на поздних сроках компостирования свидетельствует о замедленном, по сравнению с компостом, процессе деструкции лигнина.

Среди гидролазных ферментов нами были выбраны целлюлаза, инвертаза и уреаза. Максимумы целлюлазной активности компоста

совпадали с максимумами температуры и количеством аэробных целлюлозолитиков (рисунок 5.3.2.3), тогда как инвертазная активность, пройдя через небольшой пик, снижалась к 6 нед. компостирования, затем значительно возрастала и стабилизировалась к 13 нед. Согласно [464], высокая инвертазная активность характерна для почв с высоким уровнем плодородия.

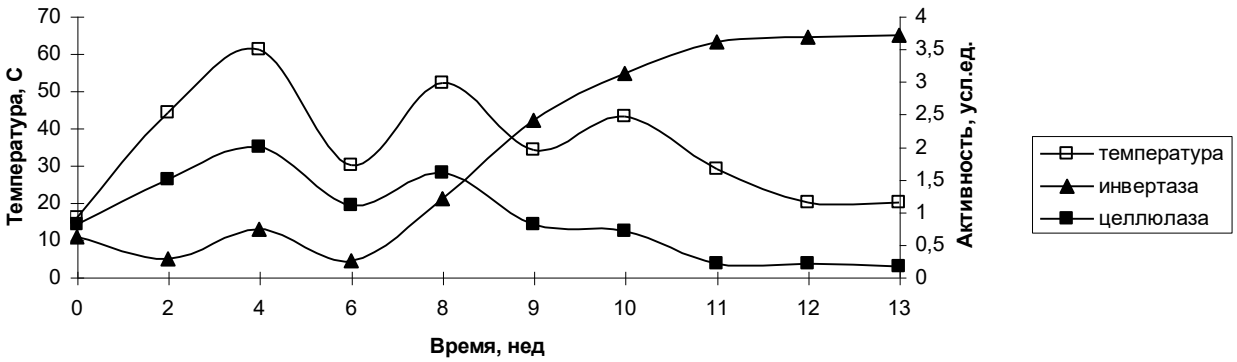


Рисунок 5.3.2.3 - Изменение активности гидролаз в процессе компостирования гидролизного лигнина.

Уреазная активность имела максимум в 8 нед. компостирования, после чего она плавно снижалась, опускаясь почти до нуля к 3 мес. ферментации (рис. 5.3.2.4). Некоторые авторы [463, 465] отмечали высокий уровень фермента в первой половине компостирования опилок с ингибированием в конце процесса, тогда как использование в качестве субстрата навоза проводило к повышению целлюлазной активности лишь к концу компостирования [170]. Динамика уреазной и инвертазной активностей также зависит от вида используемого для компостирования материала [90, 452].

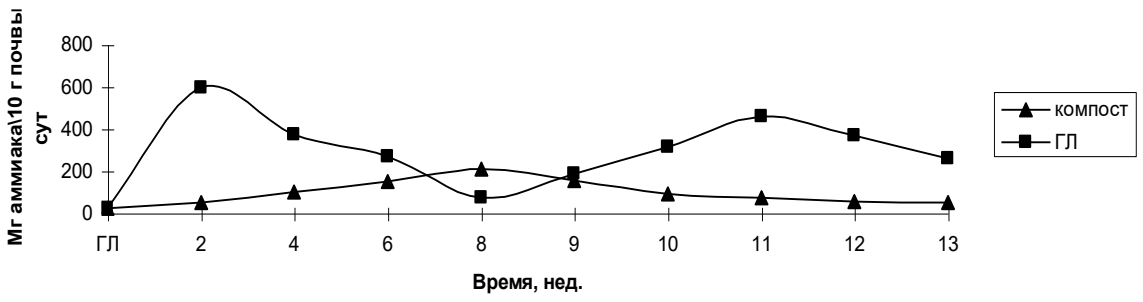


Рисунок 5.3.2.4 - Изменение активности уреазы в процессе компостирования гидролизного лигнина

Динамика целлюлазной и инвертазной активностей в контроле характеризовалась более низкими показателями и отсутствием максимума через 4 нед. эксперимента. Динамика уреазной активности в контроле имела более сложный характер (подъемы на 2 и 11 нед.), не зависела от температуры и не коррелировала с количеством микроорганизмов какой-либо группы.

Нами впервые изучена биодеструкция компонентов нефти штаммами микроорганизмов-нефтедеструкторов, выделенными из эндо- и ризосферы растений [466]. Установлено, что незагрязненная почва практически не обладает пероксидазной активностью, а активность полифенолоксидазы и каталазы находится на среднем уровне (рисунок 5.3.2.5). Исследования модельного загрязнения почвы нефтью, проведенные в вегетационных сосудах, показали, что через пять суток после внесения нефти в почву активность исследуемых ферментов резко увеличивается. По-видимому, это связано с активизацией почвенной микрофлоры, вынужденной в короткие сроки нейтрализовать большое количество токсичных соединений.

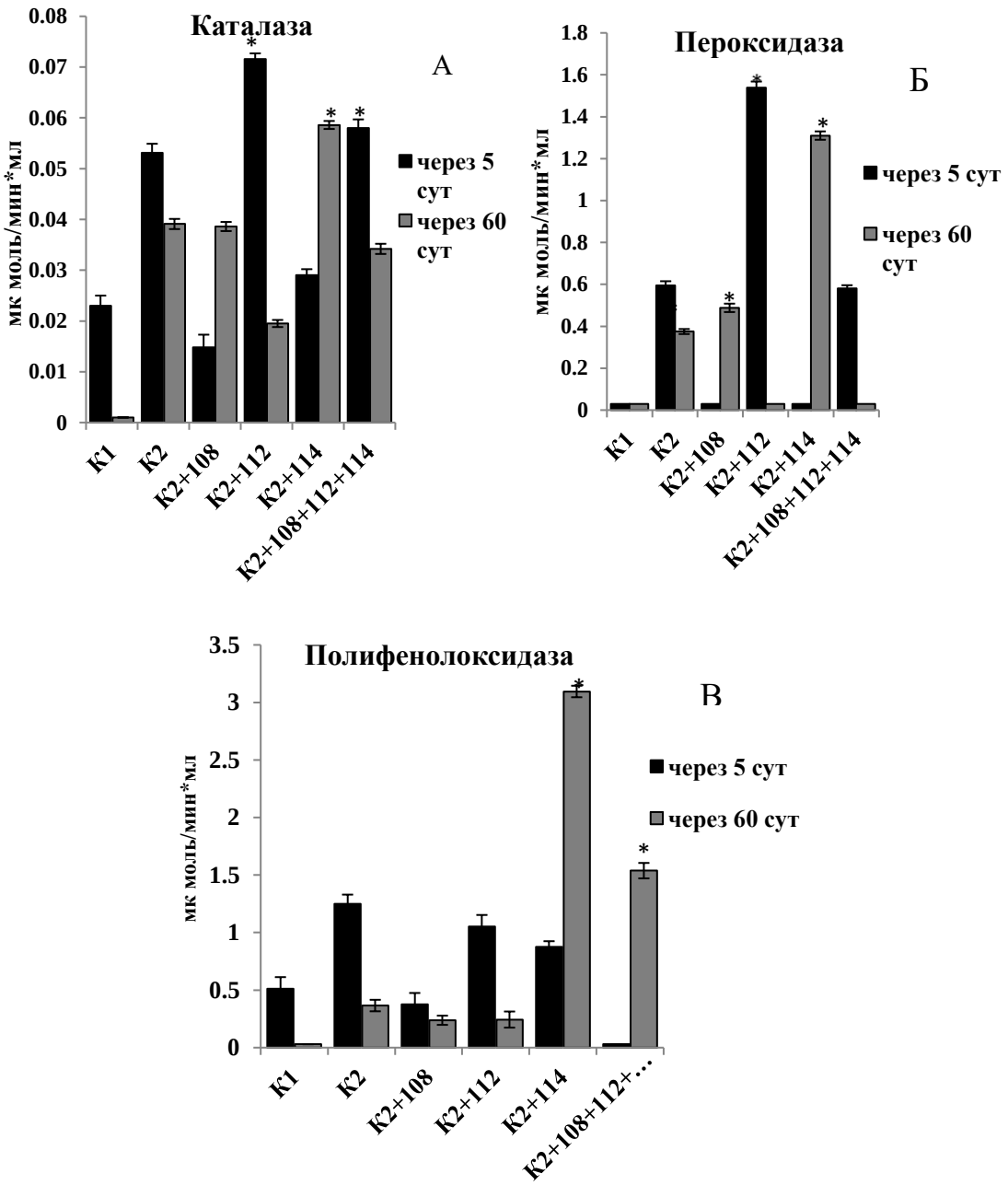


Рисунок 5.3.2.5 - Определение ферментативной активности почвы: К1 - незагрязненная почва, К2 - почва, загрязненная нефтью без бактерий, К2+108 - загрязненная почва+штамм *R. Erythropolis* 108, К2+112 - загрязненная почва+штамм *A. guillouiae* 112, К2+114 - загрязненная почва+штамм *A. guillouiae* 114, К2+108+112+114 - загрязненная почва+консорциум *R. Erythropolis* 108 +*A. guillouiae* 112+*A.guillouiae* 114
Примечание: звездочкой показаны достоверные различия показателя от контроля 2, при уровне значимости $p \leq 0,05$

Через два месяца эксперимента активность исследуемых ферментов снижалась. Обработка загрязненной почвы штаммом *A. guillouiae* 112 приводила к возрастанию активности всех трех ферментов через пять суток

после начала эксперимента. Данный штамм характеризуется высокой скоростью разложения ароматической составляющей нефти [467], что способствует выделению в водную фазу большого количества низкомолекулярных фенольных веществ, являющихся продуктами и субстратами исследуемых ферментов. При внесении штамма *A. guillouiae* 114 наблюдалась обратная картина. Максимальная активность ферментов приходилась на конец исследования. Скорее всего, это связано с различными путями деструкции компонентов нефти этими микроорганизмами.

Внесение в загрязненную нефтью почву штамма *R. erythropolis* 108 практически не влияло на активность ферментов. Введение консорциума микроорганизмов увеличивало активность пероксидазы и каталазы аналогично действию штамма *A. guillouiae* 112, однако активность полифенолоксидазы увеличивалась лишь к концу эксперимента.

5.3.3 Фитотоксичность трансформируемых субстратов

Один из наиболее важных параметров как для созревающего удобрения, так и для очищаемой почвы – фитотоксичность. Известно, что попадание в почву токсичных продуктов разложения конденсированных соединений приводит к замедлению развития растений [468]. Более того, даже сублетальные концентрации загрязнителя сильно тормозят их рост [469]. Определение фитотоксичности созревающего компоста проводили на семенах пшеницы. Выявлено, что исходный ГЛ не обладает фитотоксичностью (это характерно и для опилок), но уже двухнедельная его переработка ведет к значительному ее повышению (рисунок 5.3.3.1). При этом фитотоксичность четко коррелирует с активностью ферментов. Максимальная фитотоксичность совпадала по времени с первыми максимумами активности пероксидазы и ПФО. Установлено, что для снижения токсичности до уровня интактной почвы необходимо компостирование в течение 3 мес.

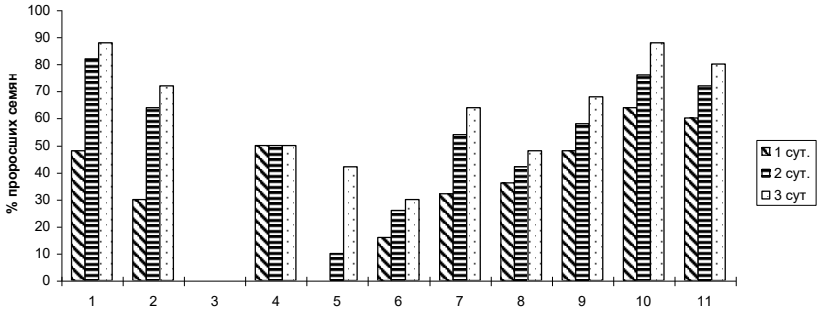


Рисунок 5.3.3.1 - Изменение фитотоксичности в процессе компостирования гидролизного лигнина. 1 – контроль, 2 – гидролизный лигнин, 3 – гидролизный лигнин с минеральными добавками, 4 – почва, 5 – компост 2 нед., 6 – 4 нед., 7 – 6 нед., 8 – 8 нед., 9 – 10 нед., 10 – 12 нед., 11 – 13 нед.

Вероятнее всего, основную фитотоксичность обусловливают низкомолекулярные фенольные вещества, образующиеся в процессе деструкции как нефти, так и лигнина. Известно, что подобные соединения способны оказывать влияние на рост и развитие растений [470]. Причем одно и то же соединение может проявлять противоположные эффекты при воздействии на разные растения. Так, например, накопление кофейной кислоты способствует прерыванию покоя семян арахиса [471], а на клубни картофеля оказывает обратное действие [472]. Кроме того, направленность действия фенольного вещества зависит от его концентрации в реакционной среде, ее кислотности, а также от присутствия других соединений, проявляющих эффект синергизма или антагонизма. Концентрации фенольных веществ, при которых проявляется их физиологическое действие, существенно выше, чем у фитогормонов, и составляют 0.0001-0.01 мг/мл [473]. 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 % (рисунок 5.3.3.2). Исключение составляла ванилиновая кислота, которая стимулировала всхожесть семян даже в высоких концентрациях. Феруловая кислота в очень

низких концентрациях также проявляла стимулирующий эффект. Однако, в вегетационных опытах ее влияние было положительным только в случае пшеницы (таблица 5.3.3.1). Рост кукурузы подавлялся полностью, а у ячменя – только развитие корня. Влияние остальных исследованных фенолокислот было разноплановым с общей тенденцией к стимуляции развития пшеницы и роста надземной части ячменя, и негативным эффектом на рост кукурузы.

Таким образом, фенолокислоты влияют на рост и развитие тестовых растений, снижая их основные ростовые показатели.

Таблица 5.3.3.1 - Действие фенолокислот (концентрация действующего вещества 0.005 %) на растения, % от контроля

	фенолокислота	Длина ростка	Масса ростка	Длина корня	Масса корня
пшеница	феруловая	127	109	121	116
	п-оксибензойная	142	128	81	131
	коричная	131	125	95	125
	ванилиновая	134	122	110	91
	кофейная	95	108	109	138
ячмень	феруловая	138	131	92	88
	п-оксибензойная	126	112	94	103
	коричная	106	105	84	112
	ванилиновая	115	105	89	93
	кофейная	97	95	69	90
кукуруза	феруловая	45	46	80	28
	п-оксибензойная	65	62	60	23
	коричная	29	28	83	42
	ванилиновая	65	60	11 9	41
	кофейная	76	110	109	56

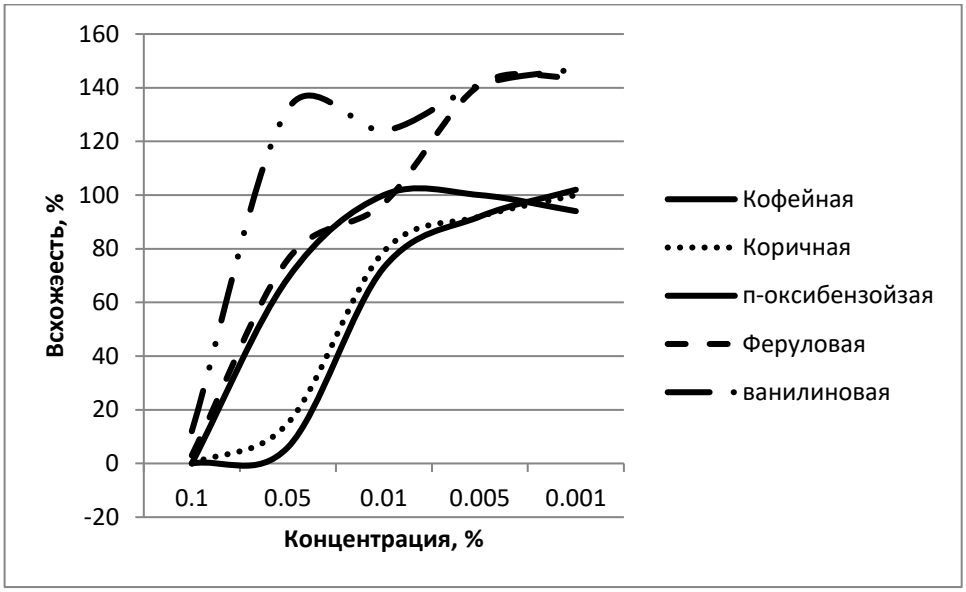


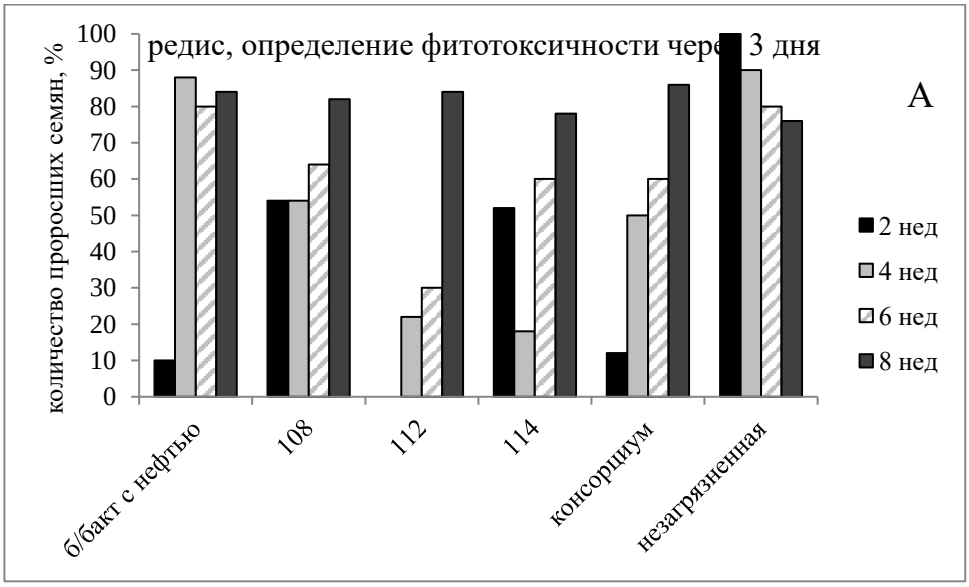
Рисунок 5.3.3.2 - Фитотоксичность фенолокислот в зависимости от концентрации их раствора (% от контроля)

В процессе биодеструкции нефти образуется большое количество соединений, токсичность которых выше, чем самой нефти. Поэтому определение уровня фитотоксичности может служить косвенным показателем активности разложения нефти в почве. Фитотоксичность не зависит от воздействия нефти на физико-химические свойства почвы, так как методика эксперимента основана на оценке прямого токсического эффекта преимущественно водорастворимых соединений.

Для оценки фитотоксичности почвы, подвергающейся биоремедиации, нами были выбраны семена растений, относящихся к разным таксономическим группам и с разным размером семени (горох, пшеница, редис), так как один и тот же загрязнитель может по-разному воздействовать на различные растения, а крупные семена за счет наличия большого запаса питательных веществ гораздо меньше реагируют на внешние воздействия [474]. Проведенные опыты показали, что наиболее чувствительны к воздействию нефти семена редиса. Через две недели после внесения в почву сырой нефти происходило резкое снижение всхожести его семян (рисунок 5.3.3.3 А). Однако во всех последующих опытах она практически не отличалась от контроля. Вероятно, в первые две недели эксперимента токсический эффект оказывает быстро разлагаемая фракция нефти.

Основные компоненты нефти остаются неизменными, о чем свидетельствует отсутствие фитотоксичности.

Наиболее высокая фитотоксичность была обнаружена после обработки загрязненной нефтью почвы штаммом *A. guillouiae* 112. Ранее нами было установлено, что этот штамм характеризуется высокой скоростью биодеструкции модельных соединений нефти [467]. Снижение фитотоксичности происходило только к концу эксперимента. Максимальный токсический эффект почвы, обработанной *A. guillouiae* 114, наблюдался через четыре недели. Несмотря на принадлежность этих штаммов к одному виду, механизмы разложения ими ароматических соединений нефти различны [467]. Этим и объясняются различия в динамике фитотоксичности почвы. Наименьший токсический эффект на семена редиса на протяжении всего эксперимента оказывала почва, обработанная *R. erythropolis* 108. В случае использования консорциума микроорганизмов в первые две недели наблюдалось резкое увеличение фитотоксичности, затем она постепенно снижалась. Через восемь недель после внесения нефти и бактерий фитотоксичность практически не отличалась от контроля (рисунок 5.3.3.3 А).



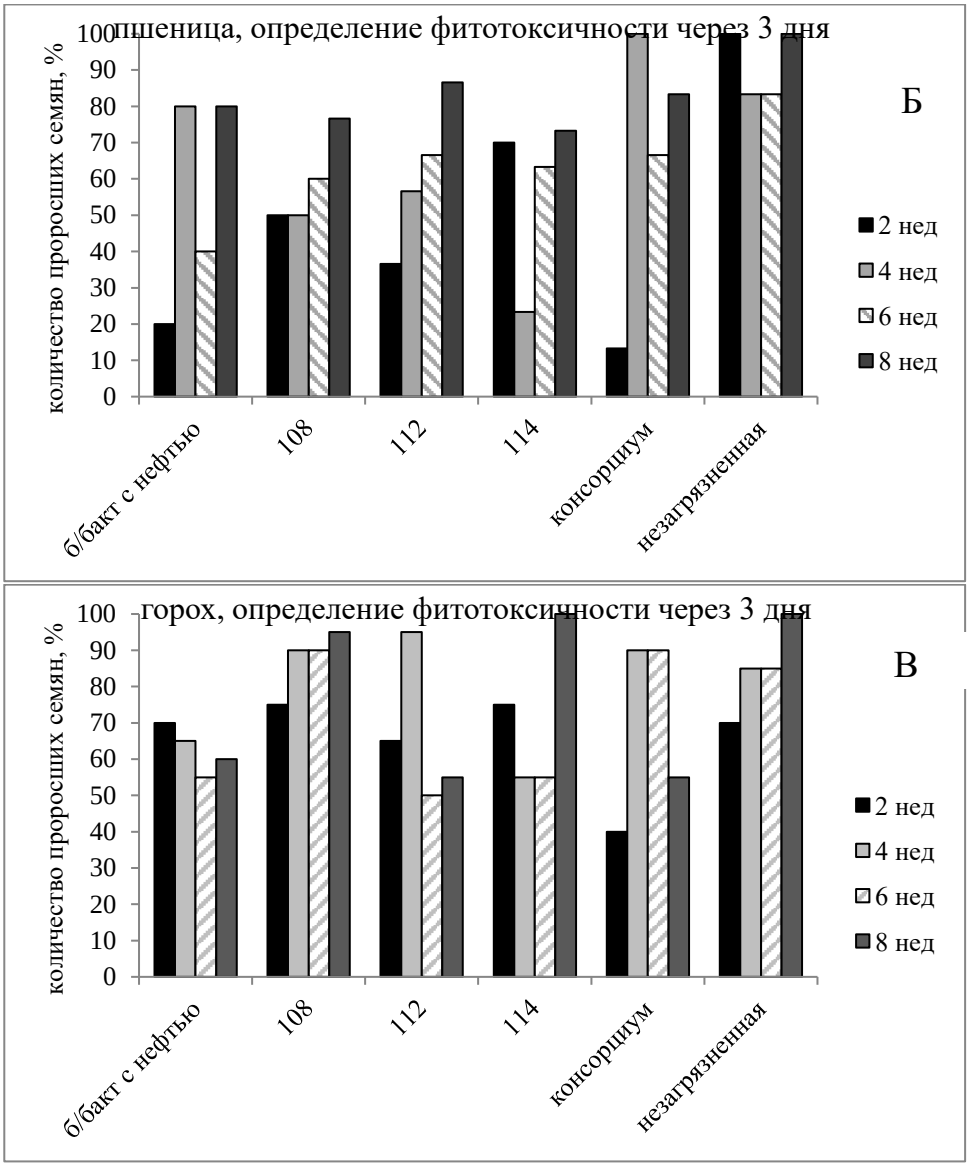


Рисунок 5.3.3.3 - Оценка фитотоксичности почвы: А - редис, Б - пшеница, В - горох

Аналогичные результаты были зафиксированы для пшеницы (рисунок 5.3.3.3 Б). Влияние нефтезагрязнения на всхожесть семян гороха было незначительным и сдвигалось на более поздние сроки после внесения нефти (рисунок 5.3.3.3 В).

Еще одним важным показателем, характерным для процессов восстановления почвы в ходе ее очистки, является интенсивность дыхания [475]. Как видно из рисунке 5.3.3.4, показатель эмиссии CO_2 в незагрязненной почве в течение всего эксперимента снижался почти на

порядок. Подобная динамика эмиссии CO_2, связанная с исчерпанием доступного субстрата, характерна для инкубационных экспериментов [476].

Загрязнение почвы сырой нефтью на протяжении всего эксперимента способствовало повышению уровня дыхания в среднем в 2.5 раза. По-видимому, за счет увеличения содержания доступного для микробиоценоза органического углерода активизировалась углеводородокисляющая аборигенная микрофлора. Подтверждением этого является увеличение общего количества микроорганизмов при загрязнении почвы нефтью (см. рисунок 5.3.1.4). Внесение штамма *R. erythropolis* 108 стимулировало эмиссию углекислого газа на 74 % относительно загрязненной нефтью почвы. Высокий уровень эмиссии CO_2 отмечался при внесении в почву штамма *A. guillouiae* 114 и консорциума микроорганизмов. Внесение штамма *A. guillouiae* 112, напротив, способствовало подавлению эмиссии CO_2 относительно загрязненной нефтью почвы (рисунок 5.3.3.4). При этом подавление эмиссии по времени совпадало с периодом высокой фитотоксичности.

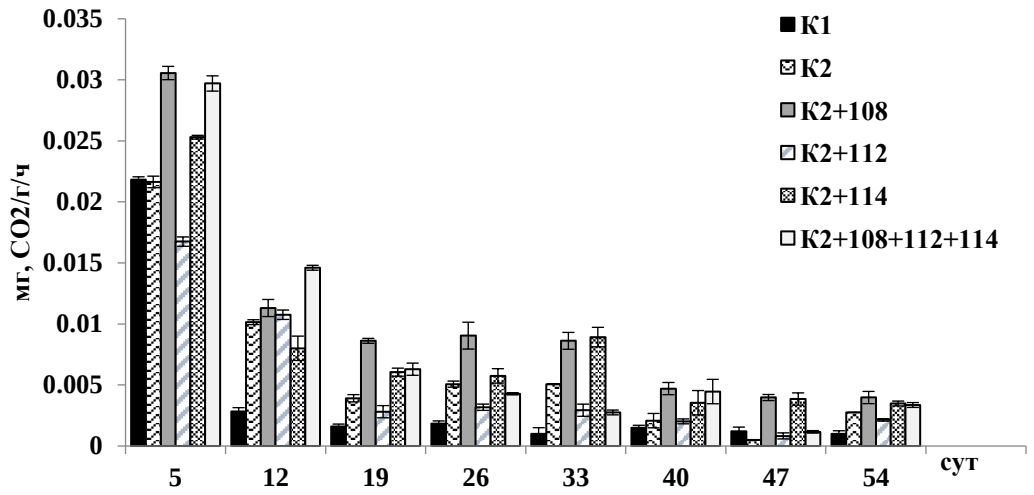


Рисунок 5.3.3.4 - Интенсивность эмиссии CO_2: К1 - незагрязненная почва, К2 - внесение нефти без бактерий, К2+108 - загрязненная почва+штамм *R. Erythropolis* 108, К2+112 - загрязненная почва+штамм *A. guillouiae* 112, К2+114 - загрязненная почва штамм *A. guillouiae* 114, К2+108+112+114 - загрязненная почва+консорциум *R. Erythropolis* 108 +*A. guillouiae* 112+*A. guillouiae* 114

Таким образом, процессы, происходящие как при компостировании лигноцеллюлозных отходов, так и при очищении почвы от нефти, являются однотипными. Одним из основных параметров трансформации исследуемых субстратов является увеличение фитотоксичности, совпадающее с максимумами активности оксидоредуктазных ферментов. 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 эффективной деятельности 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 приходят в норму. Соответственно, процессы, без обработки растягивающиеся на десятилетия, происходят в течение 2-3 месяцев и приводят к полному отсутствию токсичности продукта. 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, высокой емкостью катионного обмена и низкой гидролитической кислотностью. Все эти параметры являются показателями высокого качества органического удобрения.

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

Создание новых микробных препаратов всегда направлено на их практическое применение [477, 478]. Разрабатываемые для практического использования препараты должны соответствовать экономическим и экологическим требованиям [479]. Так, для удобрений основным показателем служит повышение урожайности сельскохозяйственных культур, а для нефтедеструкторов – степень очистки почвы от нефти. Препарат и/или полученные с его применением продукты должны соответствовать санитарным нормам РФ.

Нами были проведены комплексные исследования, предваряющие вывод препарата в промышленное использование [480].

6.1 Санитарно-гигиенические показатели лигноцеллюлозных компостов

Проведенные нами исследования готовых компостов на содержание тяжелых металлов, мышьяка и патогенных микроорганизмов (таблица 6.1.1) показали их полное соответствие санитарно-эпидемиологическим нормам и ПДК.

По данным Центра гигиены и эпидемиологии в Иркутской области во всех образцах компостов лектозоположительные палочки, патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, фекальные стрептококки, клостридии, жизнеспособные яйца гельминтов и личинки и куколки мух отсутствуют.

Таблица 6.1.1 - Содержание токсичных и опасных веществ (средние результаты по всем компостам)

Микроэлементы и тяжелые металлы	Содержание, мг/кг	ПДК для почвы, мг/мл
цинк (Zn)	36±1.2	100.0
никель (Ni)	<2.0	85.0
кобальт (Co)	<1.0	5.0
медь (Cu)	4.2±0.6	55.0
кадмий (Cd)	0,21±0.01	0.5
свинец (Pb)	0.40±0.05	30.0
ртуть (Hg)	0.007±0.0002	2.1
мышьяк (As)	<3.0	10.0

6.2 Продуктивность агроценозов при использовании лигноцеллюлозных компостов

Современные тенденции развития органического земледелия требуют от сельхозпроизводителей применения высококачественных удобрений. Тем не менее, в большинстве случаев фермеры обходятся лишь минеральными добавками, что значительно ухудшает агрохимическое состояние почв. Это связано с истощением гумусового слоя из-за интенсивной деятельности микроорганизмов. Потеря 0.1 % гумуса ежегодно ведет к недобору зерна до 1 ц/га [274]. Для стабильного функционирования агроценозов необходимо их периодическое «оздоровление», заключающееся, в первую очередь, во внесении в почву органического вещества. Восстановление потерь гумуса может быть обеспечено внесением богатых лигнином субстратов – соломы, торфа, опилок, коро-минеральных смесей и компостов на их основе. Органические удобрения, наряду с другими их положительными качествами, служат дополнительным источником биологически активных веществ для

растений [481, 482]. Кроме того, они стимулируют размножение ризосферной микрофлоры, также являющейся активным поставщиком этих веществ.

Для оценки качества удобрения необходимо проведение его вегетационных и сельскохозяйственных испытаний.

Для компостов на основе опилок были проведены вегетационные опыты (таблица 6.2.1). Редис и томат оказались наиболее отзывчивыми на внесение удобрения, все исследованные параметры увеличивались более чем на 50 %. Развитие остальных сельскохозяйственных культур тоже ускорялось, особенно заметно увеличение корневой части растения.

Таблица 6.2.1 - Результаты вегетационных исследований сельскохозяйственных культур при внесении компоста1 из опилок

	Росток,%		Корень, %	
	длина	масса	длина	масса
Контроль, 1 кг/м^2	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

Полевые опыты на опилочных компостах были проведены только для картофеля. Компост вносили по 0.2 кг в лунку перед посадкой или под перепашку из расчета 1 кг/м^2. Повышение урожайности достигалось до 40-50 % (таблица 6.2.2).

Таблица 6.2.2 - Влияние удобрения на основе опилок на урожайность картофеля

Вариант	Урожайность	Увеличение урожайности	
	ц/га		%
Контроль	164	-	-
$N_{90}P_{60}K_{60}$	196	32	20
Компост 0.2 кг/лунка	244	80	49
Компост 1 кг/м^2	228	64	39
$НСР_{05}$	34		-

Для компостов на основе ГЛ были проведены полевые мелкоделяночные опыты, в результате которых выявлено повышение урожайности пшеницы и ячменя при внесении компоста в дозе 10 т/га в среднем на 130 % и 67 % соответственно (таблица 6.2.3). Исходный ГЛ, как сам по себе, так и с минеральными добавками, не оказывал достоверного влияния на урожайность исследованных культур. Интересно, что в опытных и контрольных вариантах масса тысячи зерен пшеницы мало различалась, хотя урожай зерна заметно превышал контроль. Следовательно, рост урожайности в данном случае связан с увеличением количества зерен в колосе.

Визуальные наблюдения посевов кукурузы в период вегетации выявили заметные различия в вариантах опыта (рисунок 6.2.1). Растения, выращенные на компосте, отличались более темной окраской, значительно большей высотой и листовой массой. Анализ данных по урожайности зеленой массы кукурузы (таблица 6.2.4) показал, что внесение лигнокомпоста в дозе 60 и 30 т/га обеспечивает прибавку 215 и 135 % соответственно. Содержание питательных веществ (N, P, K) в продукции в этих вариантах также значительно выше. Перегной в тех же дозах и сложное минеральное удобрение обеспечивали меньшее повышение урожайности. Содержание тяжелых металлов в продукции для всех исследованных вариантов не превышало допустимой концентрации.

Рисунок 6.2.1 - Влияние компоста на рост кукурузы (справа – контроль)

Таблица 6.2.3 - Действие компоста на основе гидролизного лигнина на урожайность зерновых культур

Вариант	Пшеница					Ячмень			
	% зеленых колосков	масса 1000 зерен, г	урожай-ность, ц/га	отклонение от контроля		масса 1000 зерен, г	урожай-ность, ц/га	отклонение от контроля	
				ц/га	%			ц/га	%
Контроль (почва)	9.0	18.3	6.7	-	-	20.7	23.9	-	-
ГЛ	3.8	17.7	6.0	-0.7	-10.4	22.4	23.1	-0.8	-3.3
ГЛ+минеральные добавки	4.7	22.7	7.9	1.2	17.9	28.2	44.7	20.8	87.0
Компост 3 месяца	1.7	17.8	16.6	9.9	147.8	29.7	45.0	21.1	88.3
Компост 1 год	2.8	20.5	16.8	10.1	150.7	27.5	40.4	16.5	69.0
$НСР_{05}$ 1999 г.			2.5				5.2		
$НСР_{05}$ 2000 г.			3.5				3.2		

Таблица 6.2.4 - Действие удобрений на урожайность и качество зеленой массы кукурузы

Вариант	Урожай-ность, ц/га	Увеличе-ние урожай-ности		Высота, см	Нитраты, мг/кг сырой массы	Содержание питательных веществ, % на абс. сухое вещество			Тяжелые металлы (валовая форма), мг/кг сухого вещества			
		ц/га	%			N	P_2O_5	K_2O	Pb	Cd	Zn	Cu
Контроль	188	-	-	85	343	1.37	0.24	1.92	0.62	0.14	19.0	2.40
$N_{90}P_{60}K_{60}$	244	56	30	120	386	1.46	0.23	1.87	0.62	0.12	20.3	2.35
Компост 30 т/га	441	253	135	156	1095	1.71	0.33	2.06	0.60	0.13	20.8	2.39
Компост 60 т/га	591	403	215	180	2187	2.00	0.48	2.68	0.61	0.11	21.4	2.27
Перегной 30 т/га	223	105	56	137	500	1.45	0.27	2.15	0.64	0.11	21.8	2.32
Перегной 60 т/га	345	157	84	143	598	1.60	0.29	2.15	0.65	0.13	21.2	2.20
$НСР_{05}$	28		-	ПДК	500	МДУ			5.00	0.30	50.0	30.0

Варианты с внесением компоста под картофель в дозе 10 и 20 т/га достоверно превосходили по урожайности контрольный опыт (таблица 6.2.5). Однако различия опытных вариантов между собой оказались ниже наименьшей существенной разницы для уровня вероятности 95 % (менее 87 ц/га), т. е. прирост урожая за счет компоста оказался несущественным по сравнению с прибавкой, обеспеченной минеральным удобрением. Сравнение качества клубней картофеля по вариантам не выявило существенных различий, за исключением содержания крахмала. Его количество в одинаковой мере возросло в опытах с внесением компоста в обеих испытанных дозах. Отмечено избыточное накопление нитратов в продукции, даже в контроле. Это может свидетельствовать о дисбалансе доступных форм азота, фосфора и калия в почве. Внесение сложного минерального удобрения несколько нивелировало неблагоприятное соотношение между этими основными элементами питания, в результате чего содержание нитратов снизилось до уровня ПДК [455].

Выращивание пшеницы и кукурузы с компостом сказалось на сроках их созревания. У кукурузы наблюдалось более раннее выметывание метелок, а количество зеленых колосьев пшеницы на момент уборки урожая составляло 1.4-2.8 %, в то время как в контроле - 9 %. В условиях Сибири подобное ускорение созревания культуры является весьма благоприятным.

Анализ агрохимической характеристики почв до внесения удобрений и после уборки урожая кукурузы (таблица 6.2.6) показал, что применение сложного минерального удобрения практически не изменяет обеспеченность почвы биогенными элементами. В то же время в вариантах с компостом значительно увеличилось содержание подвижного фосфора (до 250-280 мг/кг), калия (до 64-88 мг/кг) и нитратного азота (до 3.9 мг/кг).

Таблица 6.2.5 - Действие удобрений на урожайность и качество картофеля

Вариант	Урожай-ность	Повышение урожайности		Содержание питательных веществ, % на абс. сухое вещество					Mg	Нитраты
	ц/га		%	N	P_2O_5	K_2O	сахара	крахмал	мг/кг	
1. Контроль	164	-	-	1.31	0.25	2.55	13.2	12.0	253	336
2. $N_{90}P_{60}K_{60}$	356	192	117	1.20	0.22	1.97	12.0	13.0	300	243
3. Компост 10 т/га	344	180	110	1.28	0.25	2.74	12.4	13.7	203	378
4. Компост 20 т/га	428	264	161	1.40	0.22	2.50	13.1	13.7	351	346
$НСР_{05}$	87		-						ПДК	250

Таблица 6.2.6 - Агрохимическая характеристика почвы опытного участка после уборки урожая

Вариант	pH_{KCl}	P_2O_5	K_2O	Гумус, %	$N\text{-}NO_3$, мг/кг	Тяжелые металлы, мг/кг			
		мг/кг				Pb	Cd	Zn	Cu
Контроль	5.0	203	55	1.2	1.5	3.44	0.15	4.45	0.15
$N_{90}P_{60}K_{60}$	5.0	214	59	1.3	2.1	3.44	0.15	3.95	0.15
Компост 30 т/га	4.9	253	64	2.0	3.9	3.65	0.16	4.10	0.12
Компост 60 т/га	4.7	284	88	2.6	3.8	3.90	0.14	3.59	0.13
Перегной 30 т/га	5.2	221	66	1.5	2.5	3.86	0.18	2.16	0.13
Перегной 60 т/га	5.4	238	87	1.9	2.0	4.23	0.16	5.05	0.14
ПДК						30.00	0.50*	100.00	55.00

* Фоновое содержание для почв мира [483].

Сравнение динамики гумуса при использовании перегноя и лигнокомпоста показало явное преимущество последнего. Содержание гумуса увеличилось в соответствии с дозой компоста до 2.0-2.6 %. Почвы делянок, где испытывали действие лигнокомпоста, после уборки урожая характеризовались более низким значением pH по сравнению с контрольным вариантом. Учитывая значительное увеличение количества продукции, полученной на этих участках, это явление можно связать с выносом урожаем кальция и магния, обеспечивающих щелочность почвенного раствора. В литературе имеются сведения об усилении кислотности почв из-за их обеднения элементами, входящими в состав растений, в том числе и основаниями [482]. Содержание тяжелых металлов осталось на уровне фона. Анализ агрохимических данных почвы после уборки картофеля не выявил значительных изменений, кроме небольшого повышения содержания фосфора, калия и гумуса [455].

Нами была исследована возможность применения лигнинового и опилочного компостов в качестве грунта для теплиц и наполнителя торфяных горшочков для рассады. Такой грунт, обладая стимулирующими свойствами, свободен от семян сорных растений, нематод и патогенных микроорганизмов. Использовались смеси компост – свежие опилки в соотношении 1:1, 1:2, 2:1. Ускорение прорастания семян наблюдалось во всех вариантах, растения быстро набирали листовую массу, образовывали хорошо развитую компактную корневую систему. Лучший результат был получен на смеси 2:1 (рисунок 6.2.2). При использовании чистого компоста у растений наблюдалось снижение тургора надземной части растений, подсыхание кромок листьев и их обесцвечивание. Прирост биомассы такой рассады по отношению к контролю существенно ниже. Их состояние облегчал обильный полив, но отставание в росте все равно было значительным. По-видимому, это связано с избытком минеральных компонентов, в частности, азота.

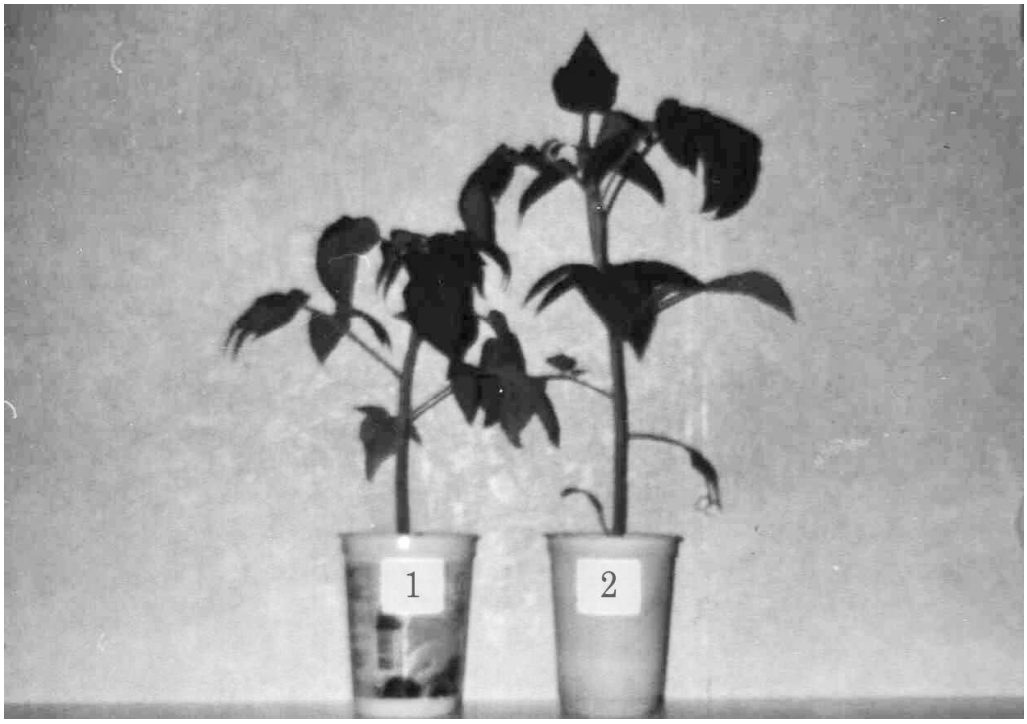


Рисунок 6.2.2 - Внешний вид рассады, выращенной на компосте
1 – смесь почва - опилки (2:1); 2 – компост – опилки (2:1)

6.3 Микробная очистка почв от нефти

На основе результатов предварительных исследований разработан микробный препарат для очистки загрязненных нефтью почв, производимой в течение теплого сезона без выемки почвы с места загрязнения. В состав препарата входит ассоциация бактерий-нефтедеструкторов, выделенных из эндо- и ризосферы растений, произрастающих на нефтезагрязненных почвах [484].

На сегодняшний день это первый микробный препарат, который адаптирован к условиям Восточной Сибири, эффективно разлагает нефть и нефтепродукты при их концентрации в почве до 20 % и низких положительных температурах. Использованные в нем микроорганизмы депонированы в коллекции ФБГУН ВКМ (г. Пущино) 12 октября 2017 г. под регистрационными номерами ВКМ - *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ac-2784D, *Acinetobacter guillouiae* B-3216D, *Acinetobacter guillouiae* B-3217D

(приложение 3). Микроорганизмы применяются в виде смеси их равных объемов с содержанием каждого компонента не менее 1×10^5 КОЕ/г, предварительно высушенных до влажности не более 10 %. Для удобства применения, 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. Приготовленная смесь высушивается 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 ^{0}С. Через два месяца в пробах почвы определяли убыль нефти. Для предложенного препарата она составляет 62 % (рисунок 6.3.1).

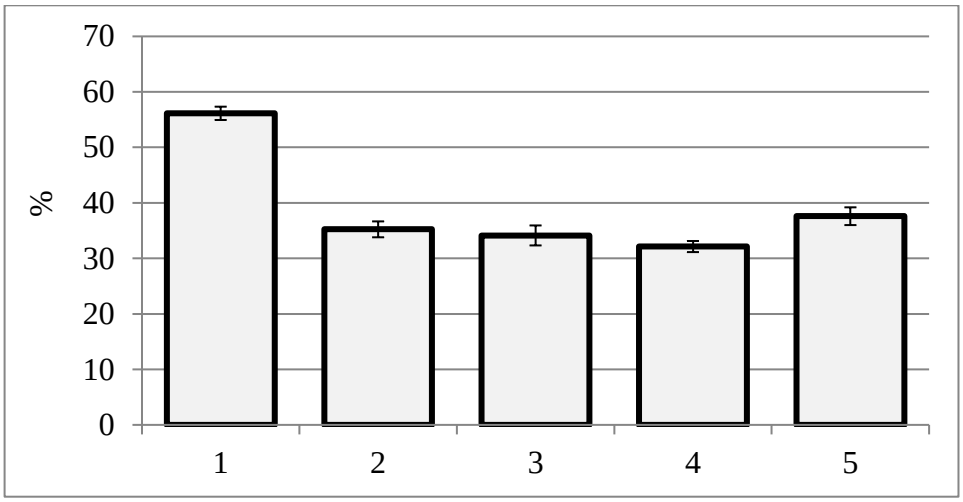


Рисунок 6.3.1 - Остаточное содержание нефти в почве за 60 сут. эксперимента (%): 1 – загрязненная почва без внесения бактерий, 2 – загрязненная почва + *R. erythropolis* 108, 3 – загрязненная почва + *A. guillouiae* 112, 4 – загрязненная почва + *A. guillouiae* 114, 5 – загрязненная почва + консорциум микроорганизмов (108+112+114).

Несмотря на отсутствие значимых различий между остаточным содержанием нефти при разложении индивидуальными штаммами и

ассоциацией, мы рекомендуем 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. Соответственно, применение препарата повышает степень очистки почв от нефтезагрязнения, что будет способствовать возвращению ее сельскохозяйственной ценности.

Таким образом, результатом практического применения созданных нами микробных ассоциаций являются 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 количество токсичных и опасных веществ в нем значительно меньше предельно допустимых концентраций их, установленных для почв. Применение препарата для биоремедиации повышает степень очистки почвы от нефтезагрязнения, что способствовует восстановлению ее сельскохозяйственной ценности и агрохимических свойств.

7 Депонирование штаммов

Исследованные культуры самых активных микроорганизмов – деструкторов углеводородов нефти депонированы во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов на базе Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН Федеральный исследовательский центр "Пущинский 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.

Заключение

Микробиоценоз в интактных почвах находится в состоянии динамического равновесия, максимально эффективно функционируя в каждый конкретный момент времени. Нами показано, что при попадании в почвенную экосистему сложного органического загрязнителя нарушается ее гомеостаз, существенно изменяется микробное сообщество, а в лигноцеллюлозных субстратах формируется новое. Все изменения направлены на минимизацию ущерба с тенденцией к самовосстановлению.

Выявлены общие закономерности, характерные для микробной трансформации сложных органических субстратов и способствующие получению целевого продукта. Использованные в настоящей работе сложные органические субстраты (нефть, опилки, гидролизный лигнин), отличаются многокомпонентностью и нерегулярностью химического состава, однако, обладают комплексом свойств, позволяющим использовать общие подходы к их переработке (схема).

На первом этапе был проведен скрининг микроорганизмов, в результате которого выбраны следующие композиции: для опилок – комплекс непатогенных грибов *Trametes versicolor, Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 и 1 MR-1, *Sporotrichum pulverulentum* 1766 и 1767, *Acremonium* sp.; для нефти предложены как чисто бактериальная композиция, состоящая из *R. erythropolis* 108 и *A. guillouiae* (112,114), так и бактериально-грибная. Введение в существующую закваску для компостирования гидролизного лигнина *Trichoderma asperellum* 3 позволило увеличить степень гумификации субстрата. Культуры *Trametes versicolor* 2, *Sporotrichum pulverulentum* 1766 и 1767 оказались эффективными как для компостирования опилок, так и для нефтедеструкции. Эксперименты по разложению модельных соединений позволили выявить пути метаболизма этих веществ различными штаммами. Из 60 культур микроорганизмов, выделенных из

эндо- и ризосферы растений, подвергавшихся хроническому нефтяному загрязнению, было выделено шесть наиболее перспективных нефтедеструкторов, относящихся к родам *Rhodococcus, Acinetobacter* и *Pseudomonas*. Большая часть выделенных культур была ассоциирована с ризосферой пырея (*Elytrigia repens*). Это свидетельствует о том, что данное растение, произрастающее в зоне хронического нефтяного загрязнения, селективно накапливает в своей ризосфере микроорганизмы, толерантные к загрязнителю и способные к его деструкции.

Микроорганизмы, входящие в состав микробных ассоциаций, вступают в симбиотические взаимодействия с различными компонентами почвенного биоценоза путем синтеза внеклеточных биологически активных соединений, нивелируя тем самым негативное воздействие загрязнителя. Образование биосурфактантов способствует эмульгированию нефтяной пленки, что ускоряет ее разрушение в почве и снижает стрессовое воздействие на растения. Фитогормональная активность дает дополнительное преимущество при встраивании штамма в ризосферный микробоценоз. Антибактериальная и фунгицидная активности обеспечивают оздоровление почвы, что также улучшает состояние растений. Комплекс образующихся биологически активных соединений обеспечивает исследованным штаммам приоритет как эффективным деструкторам органических субстратов и фитозащитным микроорганизмам. Все это способствует сохранению и восстановлению растительного покрова и микробоценоза, характерного для интактных почв.

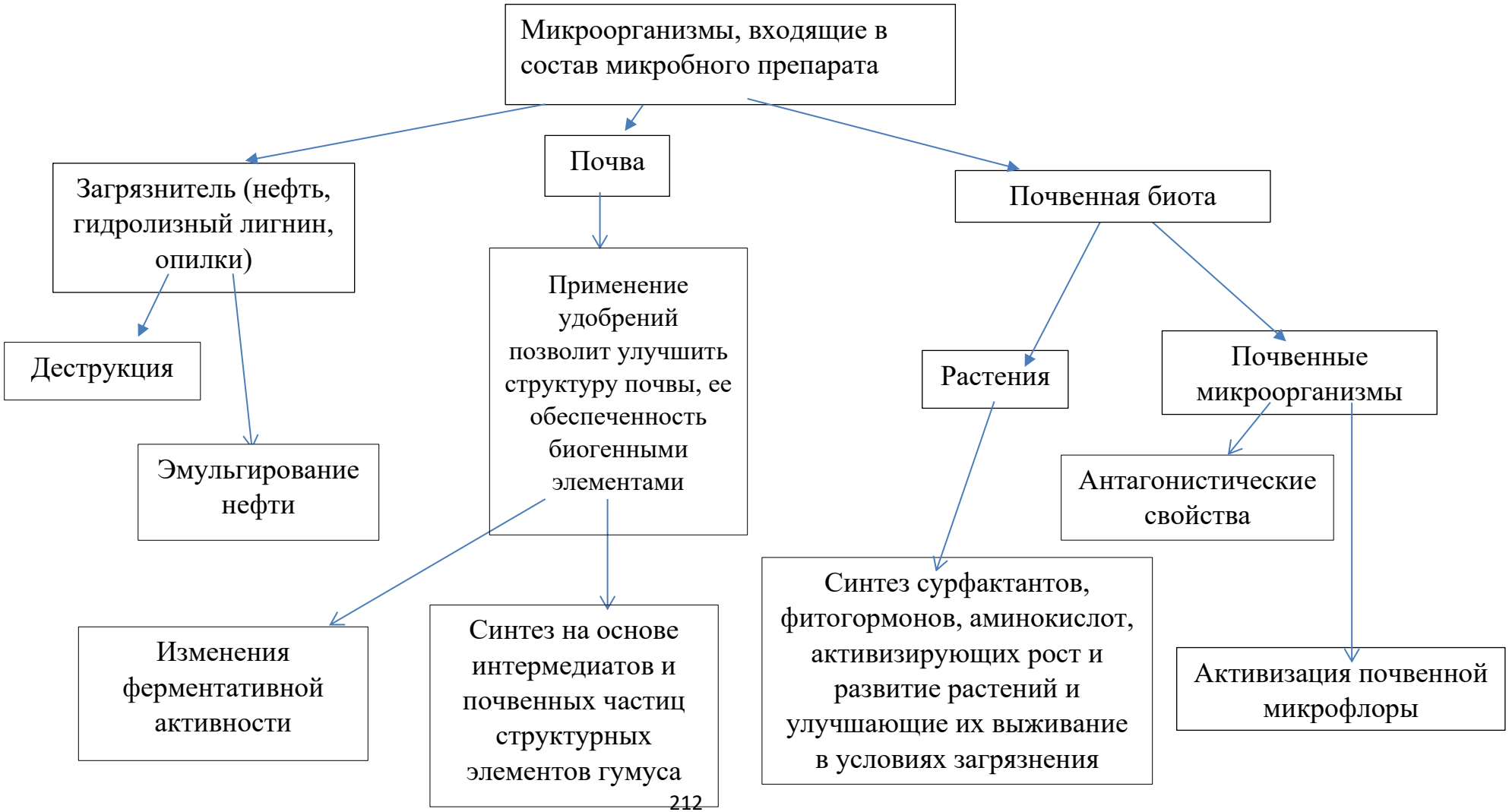
Введение высокоактивных штаммов в трансформируемый субстрат в значительной степени ускоряет процессы деструкции, прежде всего за счет выделения комплекса внеклеточных оксидоредуктаз. В результате накапливаются токсичные промежуточные продукты распада ароматических соединений, обусловливающие всплеск фитотоксичности. Однако эти соединения имеют более простое строение, чем исходный субстрат, поэтому легче включаются в метаболизм микроорганизмами - содеструкторами, не способными к самостоятельному разложению сложных ароматических

структур, количество которых возрастает в процессе деструкции. Поэтому главным отличием использования микробных препаратов для разрушения сложных биоразлагаемых субстратов является ускорение процессов их деструкции, сопровождающееся высоким, но кратковременным увеличением токсичности. Одним из критериев окончания процесса трансформации является нормализация биологических свойств почвы или лигноцеллюлозного субстрата, трансформируемого в удобрение.

Готовое удобрение характеризуется оптимальным содержанием основных биогенных элементов и гуминовых кислот, обладает высокой емкостью катионного обмена и низкой гидролитической кислотностью. Все это свидетельствует о его высоком качестве. Полученное удобрение увеличивает урожайность сельскохозяйственных культур. Оно может использоваться в качестве грунта для теплиц и при выращивании рассады с закрытой корневой системой.

Созданный на основе автохтонной микрофлоры препарат для ремедиации почв, загрязненных нефтью, достоверно повышает степень очистки почвы и обладает хорошей совместимостью с почвенной микробиотой. Ассоциация адаптирована для условий Восточно-Сибирского региона, способна эффективно функционировать при высоких концентрациях нефти, свежем нефтяном загрязнении и низких положительных температурах.

Схема. Комплексное действие микробных препаратов, используемых для биотрансформации сложных органических субстратов



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.

1. 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.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

ГК – гуминовые кислоты

ГЛ – гидролизный лигнин

ПАУ – полиароматические углеводороды

ПА - пероксидаза

ПФО- полифенолоксидаза

ГПА – гиббереллиноподобные вещества

ИУК – индолилуксусная кислота

ПАВ – поверхностно-активные вещества

УВ - углеводороды

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. FAOSTAT [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.fao.org/faostat/en/#data/FO (дата обращения: 03.10.2019)

2. Падерин, В. Рентабельность лесопиления и проблемы развития лесопиления в России / В. Падерин // ЛесПромИнформ. - №1 (99). - 2014. - С. 21-22.

3. О состоянии окружающей природной среды Иркутской области в 1996 году: Гос. докл. - Иркутск, 1997. - 230 с.

4. Запасы, производство и потребление нефти по странам мира [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.ereport.ru/articles/commod/oilcount.htm (дата обращения: 15.11.2019)

5. Миркин, Б. М. Экология России / Б. М. Миркин, Л. Г. Наумова. - М.: Изд-во АО ДС,1996. – 272 с.

6. Федеральный закон "Об отходах производства и потребления" от 24.06.1998 № 89-ФЗ.

7. Федеральный закон "Об охране окружающей среды" от 10.01.2002 № 7-ФЗ.

8. Федеральный закон «О внесении изменений в Федеральный закон «О континентальном шельфе Российской Федерации» и Федеральный закон «О внутренних морских водах, территориальном море и прилежащей зоне Российской Федерации» 30 декабря 2012 года № 287-ФЗ.

9. Исакова, Е. А. Особенности воздействия нефти и нефтепродуктов на почвенную биоту / Е. А. Исакова // Colloquium-journal. – 2019. - №12 (36). - С. 4-7.

10. Зильберман, М. В. Биотестирование почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами: монография / М. В. Зильберман, Е. А. Порошина, Е. В. Зырянова. - Пермь: Урал. гос. НИИ регион. экол. проблем. УралНИИ "Экология", 2005. - 110 с.

11. Березин, Л. В. Экология и биология почв / Л. В. Березин, Б. М. Кленов, В. В. Леонова. – Омск: Изд-во ФГОУ ВПО ОмГАУ, 2008. – С. 122.

12. Вернадский, В. И. Биосфера / В. И. Вернадский. – М. : Мысль, 1967. – 376 с.

13. Добровольский, Г. В. Функции почв в биосфере и экосистемах / Г. В. Добровольский, Е. Д. Никитин. – М. : Наука, 1990. – 261 с.

14. Ковда, В. А. Почвоведение: в 2 ч. / В. А. Ковда, Б. Г. Розанова. – М. : Высшая школа, 1983. – Ч. 1. – 400 с.; Ч. 2. – 368 с.

15. Ларионов, Ю. С. Экологическое значение биоземледелия и закона плодородия почв / Ю. С. Ларионов, О. А. Ларионова, Н. А. Ярославцев // Интерэкспо гео-Сибирь. - 2017. - Т. 4, № 2. - С. 68-77.

16. Реймерс, Н. Ф. Экология / Н. Ф. Реймерс. - М.: Изд-во Молодая гвардия, 1994. - 365 с.

17. Никитин, Е. Д. Сохранение и восстановление природных почв и экосистем как стабилизирующего экофонда биосферы / Е. Д. Никитин, Д. Н. Щеглов, О. Г. Никитина, Е. П. Сабодина // Вестник Воронежского гос. ун-та. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2015. - № 3. - С. 64-70.

18. Хазиев, Ф. Х. Экология почв Башкортостана / Ф. Х. Хазиев // Уфа: АН РБ. Гилем, 2012. – С. 312.

19. Назаров, А. В. Влияние нефтяного загрязнения на бактерии дерново-подзолистой почвы / А. В. Назаров, Л. Н. Ананьина, О. В. Ястребова, Е. Г. Плотникова // Почвоведение. - 2010. - № 12. - С. 1489-1493.

20. Галиулин, Р .В. Сравнительная оценка разложения углеводородов газового конденсата и нефти в почве под действием биологических средств / Р. В. Галиулин, Р. А. Галиулина, В. Н. Башкин, Г. С. Акопова, Е. Л. Листов, И. В. Балакирев // Агрохимия. – 2010. – № 10. – С. 52-58.

21. Колесников, С. И. Биологические свойства желтозема при загрязнении нефтью и тяжелыми металлами / С. И. Колесников, А. А. Кузина, Н. А. Вернигорова, К. Ш. Казеев, Ю. В. Акименко // Агрохимия. – 2016. - № 11. - С. 58-64.

22. Акименко, Ю. В. Оценка устойчивости экологических функций почв к загрязнению антибиотиками / Ю. В. Акименко, К. Ш. Казеев, С. И. Колесников, Т. В. Минникова // Известия Самарского научн. центра РАН. – 2017. - Т. 19, № 2-2. - С. 207-210.

23. Усманов, И. Ю. Адаптация экосистем среднего приобья в зоне нефтедобычи: иерархия и длительность процессов / И. Ю. Усманов, Э. Р. Юмагулова, В. Б. Иванов, Е. А. Коркина, А. В. Щербаков, Н. А. Иванов, А. В. Рябуха // Вестник Нижневартовского гос. ун-та. – 2016. - № 2. - С.87-94.

24. Фенгел, Д. Древесина (Химия, ультраструктура, реакции) / Д. Фенгел, Г. Вегенер. - Пер. с англ. – М.: Лесн. пром-сть, 1988. - 512 с.

25. Азаров, В. И. Химия древесины и синтетических полимеров / В. И. Азаров, Г. Н. Кононов. - М.: МГУЛ, 2011. - 368 с.

26. Berguin, P. The biological degradation of cellulose / P. Berguin, J. P. Aubert // FEMS Microbiol. Rev. – 1994. – V. 13. – P. 25–58.

27. Болотова, К. С. Морфологические особенности фибриллярной структуры растительной и бактериальной целлюлозы / К. С. Болотова, Д. Г. Чухчин, Л. В. Майер, А. А. Гурьянова // Изв. вузов. Лесной журнал. - 2016. - № 6 (354). - С. 153-165.

28. Краткая химическая энциклопедия. М.: ГНУ «Советская энциклопедия», Т. 1. А-Е. – 1961. – 1262 стб.

29. Jeffries, T. W. Biodegradation of lignin and hemicelluloses / T. W. Jeffries. - In: Ratledge C. Biochemistry of microbial degradation. - Kluwer, Dordrecht., 1994. – P. 233–277.

30. Кононов, Г. Н. Химия древесины и ее основных компонентов / Г. Н. Кононов. - М.: МГУЛ, 1999. - 247 с.

31. Огарков, В. И. Биотехнологические направления использования растительного сырья / В. И. Огарков, О. М. Киселев, В. А. Быков // Биотехнология. - 1985. - № 3. - С. 1-15.

32. Perez, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview / J. Perez, J. Munoz-Dorado, T. de la Rubia, J. Martinez // Int. Microbiol. - 2002. - V. 5. - P. 53-63.

33. Рыбин, Б. М. Определение физических показателей лигноуглеводного комплекса древесинного вещества / Б. М. Рыбин, И. А. Завражнова, Д. Б. Рыбин // Лесной вестник (Forestry bulletin). – 2018. – Т. 22, - № 5. - С. 94-102.

34. Гельфанд, Е. Д. Технология гидролизных производств / Е. Д. Гельфанд. - Л.: Наука, 1986. - 230 с.

35. Нефтегазовая энциклопедия. Издание в 3 т. под. общ. ред. Ю. В. Вадецкого. - М.: Московское отд. «Нефть и газ» МАИ, ОАО, «ВНИИОЗНТ». – 2003. - Т. 2.- 380 с.

36. Сейфуль-Мулюков, Р. Б. Нефть как носитель информации о своем происхождении, структуре и эволюции / Р. Б. Сейфуль-Мулюков // Информатика и ее применения. – 2010. - Т. 4, вып. 1, - С. 41-49.

37. Liang, Y. T. Spatial variations of hydrocarbon contamination and soil properties in oil exploring fields across China / Y. T. Liang, X. Zhang, J. Wang, G. H. Li // Journ. Hazard. Mater. – 2012. – V. 241. – P. 371–378.

38. Рябов, В. Д. Химия нефти и газа: учебное пособие / В. Д. Рябов. - М.: ИД Форум, 2009. – С. 336.

39. Dooley, J.E. Analyzing heavy ends of crude / J. E. Dooley, D. E. Hirsch, C. J. Thompson, C. C. Ward // Hydrocarbon Process. – 1974. – V. 53, no 11. – P. 141-146.

40. Давыдова, С. Л. Нефть и нефтепродукты в окружающей среде: учебное пособие / С. Л. Давыдова, В. И. Тагасов. – М.: Изд-во РУДН, 2004. – 163 с.

41. Копытов, М. А. Сравнительный анализ продуктов термического разложения и биохимического окисления смол и асфальтенов, выделенных из высоковязкой нефти Усинского месторождения / М. А. Копытов, А. А.

Гринько, Д. А. Филатов, Л. К. Алтунина // Башкирский хим. журнал. - 2013. - Т. 20, № 3. - 41-47.

42. Шуткова, С. А. Исследование надмолекулярной структуры наночастиц нефтяных асфальтенов / С. А. Шуткова, М. Ю. Доломатов, Р. З. Бахтизин, А. Г. Телин, Д. О. Шуляковская, Б. Р. Харисов, С. В. Дезорцев // Башкирский химический журнал. – 2012. – Т. 19, № 4. – С. 220-226.

43. Тремасова, А. М. Скрининг эффективных микроорганизмов для обезвреживания органических отходов и биодеградации ксенобиотиков / А. М. Тремасова, Л. Р. Валиуллин, В. Ю. Титова, М. А. Ерохондина // Актуальные вопросы совершенствования технологии производства и переработки продукции сельского хозяйства. - 2018. - № 20. - С. 342-345.

44. Kosikova, B. Biotransformation of lignin polymers derived from beech woodpulping by Sporobolomyces roseus isolated from leafy material / B. Kosikova, E. Slavikova // Biotechnol. Lett. - 2004. - V. 26, no 6. - P. 517-519.

45. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Н. С. Егорова. - М.: Изд-во МГУ., 1995. - 224 с.

46. Хасенова, Э. Ж. Подбор микроорганизмов для получения органического удобрения из осадков сточных вод / Э. Ж. Хасенова, А. Ж. Аюпова, Д. Ж. Сембаева, А. К. Молдагулова, А. С. Сарсенова, М. С. Дуамбеков, Н. Б. Молдагулова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2015. - № 11. - С. 27-32.

47. Hardy, G. E. St. J. Antagonism of fungi and actinomycetes isolated from composted eucalyptus bark to Phytophthora drechsleri in a steamed and non-steamed composted eucalyptus bark-amended container medium / G. E. St. J. Hardy, K. Sivasithamparam // Soil. Biol. Biochem. - 1995. - V. 27, no 2. - P. 243-246.

48. Велиев, М. Г. Биодеградация бакинской нефти и углеводородов микромицетами / М. Г. Велиев, Бенгт Даниелссон, М. А. Салманов, С. Р. Алиева, Н. Р. Бекташи // Нефтехимия. – 2008. - Т. 48, № 1. – С. 55-61.

49. Нарбаева, Х. С. Поиск и выделение активных штаммов деструкторов нефти и нефтепродуктов из нефтезагрязненных почв / Х. С. Нарбаева, С. Р. Угли Салохиддинов // Молодой ученый. – 2018. - № 21 (207). – С. 156-159.

50. Blanchette, R. A. Screening of wood decayed by white rot fungi for preferential lignin degradation / R. A. Blanchette // Appl. Environ. Microbiol. - 1984. - no 48. - P. 647-653.

51. Мамаева, Е. В. Деградация нефти бактериями, выделенными из донных осадков Карского моря и озера Байкал / Е. В. Мамаева, П. С. Губарев, А. Г. Горшков, О. Н. Павлова, М. Ю. Суслова, О. Н. Изосимова, Т. В. Ходжер, Т. И. Земская // Вестник Московского ун-та. Сер. 5. География. – 2018. - № 6. – С. 18-25.

52. Buswell, J. A., Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi / J. A. Buswell, Y. J. Cai, S. T. Chang, J. F. Peberdy S. Y. Fu, H.-S. Yu // World Journ. Microbiol. Biotechnol. – 1996. – V. 12, iss. 5. - P. 537–542.

Четверикова, Д. В. Новые ассоциации целлюлозолитических микроорганизмов для разложения пожнивных остатков / Д. В. Четверикова, М. Д. Бакаева, О. Н. Логинов // Изв. Уфимского науч. центра РАН. - 2019. - № 2. - С. 73–79.

54. Яковлева, М. Б., Скрининг-методы в биотехнологии (обзор). Часть 1. Поиск микроорганизмов продуцентов ферментов / М. Б. Яковлева, З. К. Никитина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2016. – Т. 19, № 4. – С. 23-32.

55. Новикова, И. И. Направленная селекция психрофильного штамма Trichoderma asperellum Г-034 ВИЗР для ускоренной утилизации полимеров растительных остатков и оздоровления почвы / И. И. Новикова, Ю. А. Титова, И. В. Бойкова, И. Л. Краснобаева // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 23(3). – С. 328-336.

56. Пырченкова, И. А. Выбор и характеристика активных психротрофных микроорганизмов-деструкторов нефти / И. А. Пырченкова,

А. Б. Гафаров, И. Ф. Пунтус, А. Е. Филонов, А. М. Воронин // Прикл. бохим. и микробиол. – 2006. - Т. 42, № 3. – С. 298-305.

57. Коршунова, Т. Ю. Микроорганизмы разлагающие нефтяные углеводороды при пониженной температуре / Т. Ю. Коршунова, А. А. Сабиров, С. П. Четвериков, М. Д. Бакаева, О. Н. Логинов // Изв. Уфимского науч. центра РАН. – 2012. - №3. С. 76-82.

58. Margesin, R. Low temperature biodegradation of petroleum hydrocarbons (n-alkanes, phenol, antracene, pyrene by four actinobacterial strains / R. Margesin, G. Moertelmaier, J. Mair // Int. Biodeter. Biodegr. - 2013. – V. 84. - P. 185-191.

59. Рогозина, Е. А. Сравнительная характеристика отечественных биопрепаратов, предлагаемых для очистки почв и грунтов от загрязнения нефтью и нефтепродуктами / Е. А. Рогозина, О. А. Андреева, С. И. Жаркова Д. А. Мартынов, Н. А. Орлова // Нефтегазовая геология. Теория и практика. – 2010. – Т. 5, № 3. – С. 1-18.

60. Кабиров, Т. Р. Использование многоуровневой системы индикации биологической активности почв для оценки эффективности методов биорекультивации нефтезагрязненных территорий: автореф. дис. … канд. биол. наук: 03.00.16, 03.00.23 / Кабиров Тагир Рустэмович. – Уфа, 2009. – 16 с.

61. Галиулин, Р. В. Сравнительная оценка разложения углеводородов газового конденсата и нефти в почве под действием биологических средств / Р. В. Галиулин, Р. А. Галиулина, В. Н. Башкин, Г. С. Акопова, Е. Л. Листов, И. В. Балакирев // Агрохимия. – 2010 – № 10. – С. 52-58.

62. Водянова М. А. Анализ существующих микробиологических препаратов используемых для биодеградации нефти в почве / М. А. Водянова, Е. И. Хабарова, Л. Г. Донерьян // Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал) - 2010. - № 7. - С. 253-258.

63. Барахнина, В. Б. Сравнительный анализ биопрепаратов для ликвидации нефтяных загрязнений почвы и воды / В. Б. Барахнина // Экологический вестник России. – 2011. – № 10. – С. 14-17.

64. Артюх, Е. А. Перспективы применения биосорбентов для очистки водоемов при ликвидации аварийных разливов нефти / Е. А. Артюх, А. С. Мазур, Т. В. Украинцева, Л. В. Костюк // Экология и системы жизнеобеспечения. Изв. СПбГТИ (ТУ). – 2014. - № 26. - С. 58-66.

65. Петров, С. В. Скрининг бактерий рода Azospirillum по способности к продукции внеклеточной лигнин-пероксидазы и деградации модельных соединений лигнина и азокрасителей / С. В. Петров, М. А. Купряшина, Е. Г. Пономарёва, С. А. Воробьёва, Е. В. Глинская, В. Е. Никитина // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. - 2017. - Т. 17, вып. 2. - С. 170-176.

66. Alvarez, M. L. Degradation of vanillic asid and prodaction of guaiacol by microorganisms isolated from cork samples / M. L. Alvarez, C. Belloch, M. Villa, F. Uruburu, G. Larriba, J.-J. R. Coque // FEMS Micsobiol. Lett. - 2003. - V. 220. - P. 49-55.

67. Eyal, S. Isolation of a Bacillus sp. capable of transforming isoeugenol to vanillin / S. Eyal, R. Usi, S. Yuval // Journ. Biotechnol. - 2000. - V. 78. - P. 1-9.

68. Маркушева, Т. В. Бактерии-деструкторы фенола и его хлорированных производных: автореф. дис. … д-ра биол. наук: 03.02.03 / Маркушева Татьяна Вячеславовна. - Уфа, 2011. – 47 с.

69. Каретникова, Е. Ф. Утилизация водорастворимых фенольных соединений, образующихся в процессе пиролиза лигнина / Е. Ф. Каретникова // Прикл. биохимия и микробиология. - 2006. - Т. 42, № 1. - С. 55-58.

70. Волчатова, И. В. Физиолого-биохимические механизмы микробиологической деструкции лигнина: дис. … канд. биол. наук: 03.00.18 / Волчатова Ирина Владимировна. - Иркутск, 1994. - 227 с.

71. Seneci, N. Composted materials as organic fertilizers / N. Seneci // Sci. Total. Environ. - 1989. - no 81/82. - P. 521-542.

72. Herrmann, R. F. Microbial community changes during the composting of municipal solid waste / R. F. Herrmann, J. F. Shann // Microbial Ecology. – 1997. – V. 33. – P. 78-85.

73. Stentiford, E. I. Composting control: principles and practice / E. I. Stentiford. - In: The Science of Composting, Part 1. - London, England, 1996. - ISBN 0751403830. - P. 49-59.

74. Finstein, M. S. Composting ecosystem management for waste treatment / M. S. Finstein, P. F. Miller, S. T. MacGregor, K. M. Psarianos // Biores. Technol. - 1983. - V. 1. - P. 347-353.

75. Cook, J. R. Basis for the control of soilborne pathogens with composts / J. R. Cook, G. A. Zentmyer // Palo Alto, California, USA: Annual Reviews, Inc. – 1986. - V. 24. - P. 93-114.

76. Sartaj, M. Influence zone of aeration pipes and temperature variations in passively aerated composting of manure slurries / M. Sartaj, N. Fernandes, N. K. Patini // Transactions of the ASAE. – 1995. – V. 38. – P. 1835-1841.

77. Hoitink, H. A. J. Effects of composts in growth media on soilborne pathogens / H. A. J. Hoitink, G. A. Kuter // In: The Role of Organic Matter in Modern Agriculture. - 1986 - P. 289-306.

78. Frost, D. I. Compost stability / D. I. Frost, B. L. Toth, H. A. J. Hoitink // Biocycle. – 1992. – V. 33. – P. 62-66.

79. Hellmann, B. Emission of climate-relevant trace gases and succession of microbial communities during open-windrow composting / B. Hellmann, L. Zelles, A. Palojarvi, Q. Bai // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – V. 63. – P. 1011-1018.

80. Seekins, B. Field test for compost maturity / B. Seekins // Biocycle. – 1996. – V. 37. – P. 72-75.

81. Sesay, A. A. Controlled composting of paper sludge using the aerated static pile method / A. A. Sesay // Compost Science and Utilization. – 1997. – V. 5. – P. 82-96.

82. Лицкевич, А. Н. Осадки сточных вод перерабатывающих предприятий как компоненты производства органических удобрений / А. Н.

Лицкевич, М. В. Гулькович, О. А. Черничко, А. И. Хинич, М. М. Дашкевич // Природопользование. – 2017.- № 31. - С. 166-172.

83. Barberis, R. Evaluation of compost stability / R. Barberis, P. Nappi // In: The Science of Composting, London, England, ISBN 0751403830. – Part 1. – 1996. - P. 175-184.

84. Ножевникова, А. Н. Состав микробного сообщества на разных стадиях компостирования, перспектива получения компоста из муниципальных органических отходов (обзор) / А. Н. Ножевникова, В. В. Миронов, Е. А. Бочкова, Ю. В. Литти, Ю. И. Русскова // Прикл. биохимия и микробиология. – 2019. - Т. 55, № 3. - С. 211-221.

85. Тен Хак Мун. Ферментация органических остатков с целью получения удобрений / Тен Хак Мун. - Хабаровск, 1988. - 47 с.

86. Корчевская, Ю. В. Обезвреживание отходов методом экологической биотехнологии / Ю. В. Корчевская, А. А. Кадысева, Г. А. Горелкина, А. А. Маджугина, И. А. Троценко // Вестник Алтайского гос. аграрного ун-та. – 2016. - № 3 (137). - С. 170-173.

87. Bohacz, J. Microbial strategies and biochemical activity during lignocellulosic waste composting in relation to the occurring biothermal phases / J. Bohacz // Journ. Environ. Management. – 2018. - V. 206. - C. 1052-1062.

88. Сидоренко, О. Д. Микробиологические основы получения компостов / О. Д. Сидоренко // Агрохимический вестник. - 1997. - № 6.- С. 3-4.

89. Veeken, A. Characterisation of NaOH-extracted humic acids during composting of a biowaste / A. Veeken, K. Nierop, V. D. Wilde, B. Hamelers // Bioresource Technol. – 2000. – V. 72. - no 1. - P. 33-41(9).

90. Herrmann, R. F. Enzyme activities as indicators of municipal solid waste compost maturity / R. F. Herrmann, J. R. Shann // Compost Sci. Utilization. – 1993. – V. 1. – P. 54-63.

91. Macaulay, B. M. Understanding the behaviour of oil-degrading micro-organisms to enhance the microbial remediation of spilled petroleum / B. M. Macaulay // Appl. Ecol. Environ. Res. – 2015. – V. 13(1). – P. 247–262.

92. Ветрова, А. А. Биодеградация углеводородов нефти плазмидосодержащими микроорганизмами-деструкторами: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06 / Ветрова Анна Андрияновна. - М., 2010. - 24 с.

93. Ившина, И. Б. Пропанокисляющие родококки / И. Б. Ившина, Р. А. Пшеничнов, А. А. Оборин. - Свердловск: Изд-во УНЦ АН СССР, 1987. – 123 с.

94. Жуков, Д. В. Механизмы деградации углеводородов нефти микроорганизмами / Д. В. Жуков, В. П. Мурыгина, С. В. Калюжный // Успехи современной биологии. - 2006. – Т. 126, № 3. - С. 285-296.

95. Тимергазина, И. Ф. К проблеме биологического окисления нефти и нефтепродуктов углеводород-окисляющими микроорганизмами / И. Ф. Тимергазина, Л. С. Переходова // Нефтегазовая геология. Теория и практика. - 2012. - Т.7, № 1.- С. 1-28.

96. Хотимский, Б. Г. Преобразование нефтей микроорганизмами / Б. Г. Хотимский, А. И. Акопиан // Труды ВНИГРИ. – Л., 1970. – 281 с.

97. Скрябин, Г. К. Использование микроорганизмов в органическом синтезе / Г. К. Скрябин, Л. А. Головлева. – М.: Наука, 1976. - 197 с.

98. Рогозина, Е. А. Некоторые теоретические аспекты восстановления нефтезагрязненных почвенных экосистем / Е. А. Рогозина, В. К. Шиманский // Нефтегазовая геология. Теория и практика. – 2007. - № 4. – С. 11-14.

99. Ветрова, А. А. Биодеструкция нефти отдельными штаммами и принципы составления микробных консорциумов для очистки окружающей среды от углеводородов нефти / А. А. Ветрова, А. А. Иванова, А. Е. Филонов, В. А. Забелин, А. Б. Гафаров, С. Л. Соколов, И. А. Нечаева, И. Ф. Пунтус, А. М. Боронин // Изв. ТулГУ. Естеств. науки. - 2013. - № 2-1. - С. 241–257.

100. Olajire, A. A. Aerobic Degradation of Petroleum Components by Microbial Consortia / A. A. Olajire, J. P. Essien // Journ. Petrol. Environ. Biotechnol. – 2014. – V. 5, no 5. – p. 1.

101. Baboshin, M. A. Aerobic Bacterial degradation of Polycyclic Aromatic hydrocarbons and its kinetic aspects / M. A. Baboshin, L. A. Golovleva // Microbiology. – 2012. – V. 81, no 6. – P. 639-650.

102. Александров, А. Ю. Влияние состава среды и условий культивирования на рост углеводородокисляющих микроорганизмов: дис. … канд. биол. наук: 03.02.03 / Александров Алексей Юрьевич. - Волгоград, 2010. - 128 с.

103. Коршунова, И. О. bph-Гены галотолерантных бактерий рода Rhodococcus, контролирующие первый этап окисления бифенила / И. О. Коршунова, Д. О. Егорова // Биология будущего: традиции и инновации. Екатеринбург, 2010. С. 98.

104. Ленева, Н. А. Деградация фенантрена и антрацена бактериями рода Rodococcus / Н. А. Ленева, М. П. Коломыцева, Б. П. Баскунов // Прикл. биохимия и микробиология.- 2009. - Т. 45. № 2, - С.188-194.

105. Кошелева, И. А. Деградация фенантрена мутантными штаммами – деструкторами нафталина / И. А. Кошелева, Н. В. Балашова, Т. Ю. Измалкова, А. Е. Филонов, С. Л. Соколов, А. В. Слепенькин, А. М. Боронин // Микробиология. - 2000. - № 6. – С. 783-789

106. Розанова, Е. П. Микрофлора нефтяных месторождений / Е. П. Розанова, С.И. Кузнецов. – Москва: Наука, 1974. - 197 с.

107. Herwijnen, R. Degradation of anthracene by Mycobacterium sp. Strain LB 501T proceeds via a novel pathway, through o-phtalic acid / R. Herwijnen, D. Sprigael, P. Slot, H. Govers, J. Parsons // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – V. 69. – P. 186-190.

108. Финкельштейн, З. И. Превращения флуорена бактериями рода *Rhodococcus* / З. И. Финкельштейн, Б. П. Баскунов, Е. Л. Головлев, Ж. Вервурт, И. М. Ритьенс, М. А. Бабошин, Л. А. Головлева // Микробиология. – 2003. - № 6. – С. 746-751.

109. Сулейманов, Р. Р. Влияние нефтяного загрязнения на динамику биохимических процессов чернозема обыкновенного / Р. Р. Сулейманов, Т.

С. Шорина // Изв. Самарского науч. центра РАН. - 2012. - Т. 14, № 1. - С. 240-243.

110. Филатов, Д. А. Микробное окисление высокомолекулярных гетероатомных соединений тяжелой нефти в модельной почвенной системе / Д. А. Филатов, М. А. Копытов, Л. К. Алтунина // Биотехнология. – 2012. - № 5. - С. 76-85.

111. Ягафарова, Г. Г. Исследование биодеструкции полиароматических соединений / Г. Г. Ягафарова, Л. Р. Атнагулова, М. И. Маллябаева, Л. Ю. Хакимова, Т. В. Тюмкина // Башкирский хим. журнал. - 2014. - Т. 21, № 2. - С. 129-133.

112. Tang, X. Biodegradation of crude oil by an artificial microalgal-bacterial consortium / X. Tang, Z. Dang, L. Y. He, G. N. Lu, X. Q. Tao // Open Access Scientific Reports. – 2012. – V. 1. - P. 118.

113. Chang, W. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated clayey soils from a sub-arctic site: the role of aggregate size and microstructure / W. Chang, A. Akbari, J. Snelgrove, D. Frgon, S. Ghoshal // Chemosphere. – 2013. – V. 91. – P. 1620 – 1626.

114. Сазыкин, И. С. Утилизация углеводородов, смол и асфальтенов нефтеокисляющими микроорганизмами Керченского пролива / И. С. Сазыкин, М. А. Сазыкина, В. А. Чистяков, А. А. Кленкин, Л. Ф. Павленко // Вода: Химия и экология. – 2011. № 1. - С. 29-34.

115. Finstein, M. S. Microbiology of municipal solid waste composting / M. S. Finstein, Morris M. L. // Appl. Microbiol. - 1975. – V. 19. – P. 113-151.

116. Tanase, A. M. Characterization of hydrocarbon-degrading bacterial strains isolated from oil-polluted soil / A. M. Tanase, R. Ionescu, I. Chiciudean, T. Vassu, I. Stoica // Int. Biodeterior. Biodegrad. – 2013. V. 84(SI). – P. 150–154.

117. Deng, M. C. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium Achromobacter sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China / M. C. Deng, J. Li, F. R. Liang, M. Yid,

X. M. Xua, J. P. Yuand, J. Pengd, C. F. Wud, J. H. Wanga // Marine Pollution Bulletin. – 2014. – V. 83, no 1. – P. 79–86.

118. Mnif, S. Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oil field-selected bacteria / S. Mnif, M. Chamkha, M. Labat, S. Sayadi // Journ. Appl. Microbiol. - 2011. – V. 111. – P. 525-536.

119. Ramadass, K. Soil bacterial strains with heavy metal resistance and high potential in degrading diesel oil and n-alkanes / K. Ramadass, M. Megharaj, K. Venkateswarlu, R. Naidu // Int. Journ. Environ. Sci. Technol. – 2016. - V. 13, no 12. - P. 2863–2874.

120. Jain, P. K. Enterobacter sp. as an engine oil degrader / P. K. Jain, M. Lowry, V. K. Gupta, V. Bajpai, S. Sharma, N. Joshi, R. K. Gaur // Biospectra. - 2010. – V. 5. – P. 115-120.

121. Rajasekar, A. Role of Hydrocarbon Degrading Bacteria Serratia marcescens ACE2 and Bacillus cereus ACE4 on Corrosion of Carbon Steel API 5LX / A. Rajasekar, R. Balasubramanian, J. V. M. Kuma // Ind. Eng. Chem. Res. – 2011. – V. 50. - P. 10041–10046.

122. Adetitun, D. O. Hydrocarbon-degrading Capability of Bacteria isolated from a Maize-Planted, Kerosene-contaminated Ilorin Alfisol / D. O. Adetitun, A. B. Olayemi, O. M. Kolawole // Biokemistri. – 2014. - V. - 26(1). – P. 13–18.

123. Ilori, M. O. Ultrastructure of Two Oil-Degrading Bacteria Isolated from the Tropical Soil Environment / M. O. Ilori, D. Amund, G. K. Robinson // Folia Microbiol. – 2000. – V. 45 (3). – P. 259-262.

124. Kumar, M. A halotolerant and thermotolerant Bacillus sp.degrades hydrocarbons and produces tension active emulsifying agent / M. Kumar, L. Vladimir, A. de Sistro Materano, O. A. Ilzins // World Journ. Microbiol. Biotechnol. – 2007. V. 23. – P. 211-220.

125. Zvyagintseva, I. S. Effect of the medium salinity on oil degradation by Nocardioform bacteria / I. S. Zvyagintseva, M. N. Poglasova, M. T. Gotoeva, S. S. Belyaev // Microbiology. - 2001. – V. 70. – P. 652–656.

126. Marinescu, M. A review of biological methods to remediate crude oil polluted the soil / M. Marinescu, A. Lacatusu, E. Gament, G. Plopeanu, V. Carabulea // Annals of the University of Craiova-Agriculture, Montanology, Cadastre Series. - 2017. – V. 46. P. 340–350.

127. Rodgers-Vieira, E. A. Identification of anthraquinone-degrading bacteria in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons / E. A. Rodgers-Vieira, Z. Zhang, A. C. Adrion, A. Gold, M. D. Aitken // Appl. Environ. Microbiol. – 2015. - V. 81. - P. 3775–3781.

128. Smułek, A. Rahnella sp. strain EK12: Cell surface properties and diesel oil biodegradation after long-term contact with natural surfactants and diesel oil / Smułek, A. Zdarta, U. Guzik, B. Dudzińska-Bajorek, E. Kaczorek // Microbiol. Res. – 2015. – V. 176. - P. 38–47.

129. Lade, A. Biodegradation and detoxification of textile azo dyes by bacterial consortium under sequential microaerophilic/aerobic processes / A. Lade, D. P. Kadam, S. Govindwar // EXCLI Journ. – 2015. – V. 14. - P. 158–174.

130. Beffa, T. Isolation of Thermus strains from hot composts (60 oC to 80 oC) / T. Beffa, M. Blanc, P. Lyon, G. Vogt, M. Aragno // Appl. Environ. Microbiol. – 1996b. – V. 62. – P. 1723-1727.

131. Yang, P. P. Effects of exogenous microorganism inoculation on efficiency and bacterial community structure of sludge composting / P. P. Yang, H. Yin, S. Y. Tang, M. Lu, H. Liu, H. Peng // Huanjing kexue. – 2017. - V. 38, no 8. – P. 3536-3543.

132. Головлева, Л. А. Микробная детоксикация сточных вод коксохимического производства / Л. А. Головлева, З. И. Финкельштейн, Б. П. Баскунов // Микробиология. - 1995. - т. 64, № 2. - С. 197-200.

133. Katzen, R. Development of Bioconversion of Cellulosic Wastes / R. Katzen, D. A. Monceaux // Appl. Biochem. Biotechnol. - 1995. - V. 51/52. - P. 585–592.

134. Leschine, S. B. Cellulose degradation in anaerobic environments / S. B. Leschine // Ann. Rev. Microbiol. – 1995. – V. 49. – P. 399–426.

135. Сельскохозяйственная микробиология. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://studme.org/296625/geografiya/biokonversiya_lignina (дата обращения: 16.11.2019).

136. Goodfellow, M. Ecology of Actinomycetes / M. Goodfellow, S. T. Williams // Ann. Rev. Microbiol. – 1983. - V. 37. – P. 189-216,

137. McCarthy, A. J. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment: a review / A. J. McCarthy, S. T. Williams // Gene. – 1992. – V. 115. – P. 189-192.

138. Куюкина, М. С. Биосурфактанты актинобактерий рода Rhodococcus: индуцированный биосинтез, свойства, применение: автореф. дисс. …д-ра биол. наук: 03.00.07 / Куюкина Мария Станиславовна. – Пермь, 2006. – 295 с.

139. Шамаева, А. А. Исследование процессов биоремедиации почв и объектов, загрязненных нефтяными углеводородами: автореф. дис. … канд. биол. наук: 03.00.16, 03.00.23/ Шамаева Алия Азатовна – Уфа, 2007. – 23 с.

140. Kuznetsov, V. D. Streptomyces Albiaxialis sp. nov.: a new petroleum hydrocarbon-degrading species of thermo- and halotolerant Streptomyces / V. D. Kuznetsov, T. A. Zaitseva, L. V. Vakulenko, S. N. Filippova // Microbiology. - 1992. – V. 61. – P. 62–67.

141. Ferradji, F. Z. Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing Streptomyces spp. isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria) / F. Z. Ferradji, S. Mnif, A. Badis, S. Rebbani, D. Fodil, K. Eddouaouda, S. Sayadi // Int. Biodeter. Biodegrad. 2014. – V. 86. – P. 300–308.

142. Lacey, J. Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance / J. Lacey. - New York: Academic Press. ISBN 0126799504. – 1973. - P. 231-251.

143. Golueke, C. G. Composting: A Study of the Process and its Principles / C. G. Golueke. - Emmaus, Pennsylvania, USA: Rodale Press, Inc. ISBN 0878570519. - 1972. – 110 p.

144. Singh, H. Mycoremediation: Fungal Bioremediation / H. Singh. - Wiley-Interscience, New York, USA, 2006. – 592 p.

145. Рябцева, Н. Д. Способность культуры Candida к биодеградации нефтепродуктов / Н. Д. Рябцева, В. С. Никитина, А. А. Кадиров, М. И. Абдуллин // Вестник Башкирского ун-та. – 2015. - Т. 20, № 4, - С. 1227-1229.

146. Bamforth, S. M. Mycoremediation of Benzo[a]pyrene by Pleurotus ostreatus in the presence of heavy metals and mediators / S. M. Bamforth, I. Singleton // Journ. Chem. Technol. Biotechnol. - 2005. - V. 80. - P. 723–736.

147. Позднякова, Н. Н. Биоремедиация нефтезагрязнанной почвы комплексом гриб *Pleurotus ostreatus* - почвенная микрофлора / Н. Н. Позднякова, В. Е. Никитина, О. В. Турковская // Прикл. биохимия и микробиология. - 2008. - Т. 44, № 1. - С. 69–75.

148. Covino, S. Oil degradation by basidiomycetes in soil and peat at low temperatures / S. Covino, K. Svobodová, Z. Kresinová, M. Petruccioli, F. Federici, A. D'Annibale, M. Cvancarová, T. Cajthaml // Bioresour. Technol. - 2010. - V. 104. - P. 3004–3012.

149. D'Annibale, A. Degradation of aromatic hydrocarbons by white-rot fungi in a historically contaminated soil / A. D'Annibale, M. Ricci, V. Leonardi, D. Quaratino, E. Mincione, M. Petruccioli // Biotechnol. Bioengineer. - 2005. - V. 90. - P. 723–731.

150. Куликова, Н. А. Деградация нефти базидиальными грибами белой гнили в почве и торфе при пониженной температуре / Н. А. Куликова, О.И. Кляйн, Д. В. Пивченко, Е. О. Ландесман, Н. Н. Позднякова, О. В. Турковская, Б. Ц. Зайчик, А. О. Ружицкий, О. В. Королёва // Прикл. биохимия и микробиология. – 2016. - Т. 52, no 6. – С. 599-608.

151.Мирчинк, Т. Г. Почвенные грибы как компонент биогеоценоза / Т. Г. Мирчинк. - М.: Наука, 1984. - С. 114-130.

152. Кивилёв, К. В. Перспективы биотехнологического использования дерево-разрушающих грибов / К. В. Кивилёв // Прикл. биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 35, № 5. – С. 659-667.

153. Медведева, С. А. Механизмы и реакции деструкции лигнина и моделирующих его ароматических соединений грибами белой гнили / С. А.

Медведева, С. Г. Середкина, В. А. Бабкин // Химия древесины. – 1992. - № 2-3. - С. 3-24.

154. Бабицкая, В. Г. Деградация природных полимеров мицелиальными грибами - продуцентами биологически активных веществ / В. Г. Бабицкая, В. В. Щерба // Прикл. биохимия и микробиология. - 1991. – Т. 27, № 5. - С. 687-694.

155. Abd-Alla, M. H. Wheat straw and cellololytic fungi application increases nodulation, nodule efficiency and growth of fenugreek (Tridonella foenum-graceum L.) grown in saline soil / M. H. Abd-Alla, S. A. Omar // Biology and Fertility of Soils. -1998. – V. 26. – P. 58-65.

156. Сазыкин, И. С. Разложение нефти микроорганизмами. Экологические аспекты / И. С. Сазыкин, М. А. Сазыкина, В. А. Чистяков // Изв. вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. - 2009. - № 6. - С. 88-92.

157. Berguin, P. The biological degradation of cellulose / P. Berguin, J. P. Aubert // FEMS Microbiol. Rev. – 1994. – V. 13. – P. 25–58.

158. Acevedo, F. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus Anthracophyllum discolor / F. Acevedo, L. Pizzul, M. Castillo, R. Cuevas, M. Diez // Journ. Hazard. Mater. - 2011. - V. 185. - P. 212–219.

159. Zeng, J. Successive transformation of benzo[a]pyrene by laccase of Trametes versicolor and pyrene-degrading Mycobacterium / J. Zeng, X. Lin, J. Zhang, H. Zhu, H. Chen, M. Wong // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2013. - V. 97, no 7. - P. 3183–3194.

160. Hadibarata, T. Potential of a white-rot fungus *Pleurotus eryngii* F032 for degradation and transformation of fluorine / T. Hadibarata, R.A. Kristanti // Fungal Biol. - 2014. - V. 118, no 2. - P. 222–227.

161.Kirk, T. K. Ligninase of Phanerochaete chrysosporium. Mechanism of its degradation of the non-phenolic arylglycerol b-aryl ether sub-structure of lignin /

T. K. Kirk, M. Tien, P. J. Kersten // Biochem. Journ. - 1986. - V. 236. - P. 279-287.

162. Glenn, J. K. An exstracellular hydrogen peroxide requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete Phanerochaete chrysosporium / J. K. Glenn, M. A. Morgan, M. B. Maytield, M. Kuwahara, M. N. Gold // Biochem. Biophys. Res. Communs. – 1983. – V. 144, no 3. – C. 1077-1083.

163. Леонтьевский, А. А. Лигнолитические ферменты гриба Panus tigrinus 8/18: биосинтез, выделение, свойства: дис. … канд. биол. наук: 03.00.04 / Леонтьевский Алексей Аркадьевич. – Пущино, 1989. - 150 с.

164. Kirk K. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white rot fungi / K. Kirk, D. Cullen. - In: Young R. A., Akhtar M. (eds) Environmental friendly technologies for pulp and paper industry. Wiley, New York, 1998. – P. 273–307.

165. Perez, J. Roles of manganese and organic acid chelators in regulat-ing lignin biodegradation and biosynthesis of peroxidases by Phanerochaete chrysosporium / J. Perez, T. W. Jeffries // Appl. Environ. Microbiol. - 1992. –V. 58. – P. 2402–2409.

166. Gomez-Toribio, V. Oxidation of hydroquinones by versatile ligninolytic peroxidase from Pleurotus eryngii. H2O2 generation and the in.uence of Mn2+ / V. Gomez-Toribio, A. Martinez, M. J. Martinez, F. Guillen // Eur. Journ. Biochem. - 2001. – V. 268. – P. 4787–4793.

167. Gianfreda, L. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes / L. Gianfreda, F. Xu, J.-M. Bollag // Bioremediation Journ. - 1999. – V. 3. – P. 1–25.

168. Медведева, С. А. Превращения ароматической компоненты древесины в б иохимических процессах далигнификации: дис. … докт. биол. наук: 02.00.03 / Медведева Светлана Алексеевна. - Иркутск, 1995. - 470 с.

169. Leonowicz, A. Fungal laccase: properties and activity on lignin / A. Leonowicz, N. S. Cho, J. Luterek, A. Wilkolazka, M. Wojtas-Wasilewska, A.

Matuszewska, M. Hofrichter, D. Wesenberg, J. Rogalski // Journ. Basic Microbiol. – 2001. – V. 41. – P. 185–22.

170. Alexandre, G. Laccases are widespread in bacteria / G. Alexandre, I. B. Zhulin // Trends Biotechnol. – 2000. – V. 18. – P. 41–42.

171. Bharadwaj G., Thermophilic fungi: their physiology and enzymes / G. Bharadwaj, M. K. Bhat // Microb. Mol. Biol. Rev. - 2000. – V. 64. – P. 461–488.

172. Eriksson, K.-E. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components / K.-E. Eriksson, R. A. Blanchette, P. Ander. - New York Berlin Heidelberg: Springer, 1990. - 120 p.

173. Vikas, S. Effect of Zn2+ and Cu2+ on growth, lignin degradation and ligninolytic enzymes in Phanerochaete chrysosporium / S. Vikas, V. S. Rathore // W. Journ. Microbiol. Biotechnol. - 2001. - V. 7. - P. 235-240.

174. Озолиня, Н. Р. Роль лакказы при биодеградации лигнина и его модельных соединений / Н. Р. Озолиня, В. Н. Сергеева // Изв. АН Латв. ССР. - 1987. - № 4 (477). - С. 126-134.

175. Нечаева, И. А. Биодеградация углеводородов нефти психротрофными микроорганизмами-деструкторами: дис. … канд. биол. наук: 03.00.23 / Нечаева Ирина Александровна. - Пущино, 2009. – 24 с.

176. Van Beilen, J. B. Genetics of alkane oxidation by Pseudomonas oleovorans / J. B. van Beilen, M. G. Wubbolts, B. Witholt // Biodegradation. - 1994. - V. 5. P. 161–174.

177. Vila, J. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by Mycobacterium sp. strain AP1: actions of the isolate on two- and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons / J. Vila, Z. López, J. Sabaté, C. Minguillón, A.M. Solanas, M. Grifoll// Appl. Environ. Microbiol. 2001. - V. 67. - P. 5497–5505.

178. Selifonov, S. A. Oxidation of naphthalenoaromatic and methylsubstituted aromatic compounds by naphthalene 1,2- dioxygenase / S. A. Selifonov, M. Grifoll, R. W. Eaton, A. J. Chapman // Appl. Environ. Microbiol. 1996. - V. 62. - P. 507–514.

179. Pirog, T. P. Microbial synthesis of phytohormones / T. P. Pirog, G. O. Iutynska, N. O. Leonova, K. A. Beregova, T. A. Shevchuk // Biotechnol. Acta. – 2018. - V. 11, no 1. - P. 5-24.

180. Boivin, S. How auxin and cytokinin phytohormones modulate root microbe interactions / S. Boivin, C. Fonouni-Farde, F. Frugier // Front. Plant. Sci. – 2016. - V. 7. - P. 1240.

181. Radhakrishnan, R. Bacillus: a biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments / R. Radhakrishnan, A. Hashem, E. F. Abd Allah // Front. Physiol. – 2017. - V. 8. - P. 667.

182. Grady, E. N. Current knowledge and perspectives of Paenibacillus: a review / E. N. Grady, J. MacDonald, L .Liu, A. Richman, Z. C. Yuan // Microb. Cell Fact. – 2016. – V. 15(1). – P. 203.

183. Кацы, Е. И. Молекулярная генетика ассоциативного взаимодействия бактерий и растений: состояние и перспективы исследований / Е. И. Кацы. - отв. ред. В. В. Игнатов – М.: Наука, 2007. – 86 с.

184. Glick, B. R. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria / B. R. Glick, Z. Cheng, J. Czarny, J. Duan // Europ. Journ. Plant Pathology. – 2007. – V. 119, no 3. – P. 329-339.

185. Spaepen, S. Indole-3-acetic acid in microbial и microorganism-plant signaling / S. Spaepen, J. Vanderleyden, R. Remans // FEMS Microbiol. Rev. – 2007. – V. 31, no 4. – P. 425-448.

186. Kim, Y. C. The Multifactorial Basis for Plant Health Promotion by Plant-Associated Bacteria / Y. C. Kim, J. Leveau, B. B. McSpadden // Appl. Environ. Microbiology. – 2011. - V. 77, no 5. - P. 1548–1555.

187. Nafisi, M. Interplays between the cell wall and phytohormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens / M. Nafisi, L. Fimognari, Y. Sakuragi // Phytochemistry. – 2015. - V. 112. - P. 63–71.

188. Ma, K. W. Phytohormone pathways as targets of pathogens to facilitate infection / K. W. Ma, W. Ma // Plant Mol. Biol. – 2016. – V. - 91(6). - P. 713–725.

189. Kazan, K. Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors / K. Kazan, R. Lyons // Plant Cell. – 2014. – V. 26(6). – P. 2285–2309.

190. Rashad, F. M. Isolation and characterization of multifunctional Streptomyces sp. with antimicrobial, nematicidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt / F. M. Rashad, H. M. Fathy, A. S. El-Zayat, A. M. Elghonaimy // Microbiol. Res. – 2015. - V. 175. - P. 34–47.

191.Singh, S. A review on possible elicitor molecules of cyanobacteria: their role in improving plant growth and providing tolerance against biotic or abiotic stress. / S. Singh // Journ. Appl. Microbiol. – 2014. – V. 117(5). P. 1221–1244.

192. Lu, Y. Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology? / Y. Lu, J. Xu // Trends Plant Sci. - 2015. – V. 20(5). – P. 273–282.

193. Santoyo, G. Plant growth-promoting bacterial endophytes / G. Santoyo, G. Moreno-Hagelsieb, C. Orozco-Mosqueda Mdel, B. R. Glick // Microbiol. Res. – 2016. - V. 183. - P. 92–99.

194.Цавкелова, Е. А. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение (обзор) / Е. А. Цавкелова, С. Ю. Климова, Т. А. Чердынцева, Л. И. Нетрусов // Прикл. биохимия и микробиология. – 2006. – Т.42, №2. – С. 133-143.

195. Liu, Y. Y. Variation in indole-3-acetic acid production by wild Saccharomyces cerevisiae and S. paradoxus strains from diverse ecological sources and its effect on growth / Y. Y. Liu, H. W. Chen, J. Y. Chou // PLoS One. – 2016. – V. 11(8). - e0160524.

196. Egamberdieva, D. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat / D. Egamberdieva // Acta Physiol. Plant. - 2009. – V. 31(4). – P. 861–864.

197. Liu, Y. Effect of IAA produced by Klebsiella oxytoca Rs-5 on cotton growth under salt stress / Y. Liu, Z. Shi, L. Yao, H. Yue, H. Li, C. Li // Journ. Gen. Appl. Microbiol. – 2013. – V. 59(1). – P. 59–65.

198.Prinsen, E. Stimulation of indole-3-acetic acid production in Rhizobium by flavonoids / E. Prinsen, N. Chauvaux, J. Schmidt, M. John, U. Wieneke, J. De Greef, J. Schell, H. Van Onckelen // FEBS Lett. – 1991. – V. 282(1). - 53–55.

199.Fu, S. F., Indole-3-acetic acid: a widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms / S. F. Fu, J. Y. Wei, H. W. Chen, Y. Y. Liu, H. Y. Lu, J. Y. Chou // Plant Signal. Behav. – 2015. – V. 10(8). – e1048052.

200. Liu, Y. Plant-microbe communication enhances auxin biosynthesis by a root-associated bacterium, Bacillus amyloliquefaciens SQR9 / Y. Liu, L. Chen, N. Zhang, Z. Li, G. Zhang, Y. Xu, Q. Shen, R. Zhang // Mol. Plant Microbe Interact. – 2016. – V. 29(4). – P. 324–330.

201. Bianco, C. Indole-3-acetic acid regulates the central metabolic pathways in Escherichia coli / C. Bianco, E. Imperlini, R. Calogero, B. Senatore, P. Pucci, R. Defez // Microbiology. – 2006. - V. 152(Pt 8). – P. 2421-31.

202. Олюнина, Л. И. Участие индолил-3-уксусной кислоты в реакции про- и эукариот на тепловой шок / Л. И. Олюнина, А. Г. Орлова, Ю. А. Мацкова, В. П. Французова // Сигнальные системы клеток растений: Роль в адаптации и иммунтитете. Тез. докл. Казань, 2006. - С. 90-92.

203. Phillips, D. A. Studies on cytokinin production by Rhizobium / D. A. Phillips, J. G. Torrey // Plant Physiol. – 1972. – V. 49(1). - P. 11–15.

204. Цыганова, А. В. Роль поверхностных компонентов ризобий в симбиотических взаимодействиях с бобовыми растениями / А. В. Цыганова, В. Е. Цыганов // Успехи современной биологии. – 2012. - Т. 132, № 2. - С. - 211-222.

205. Kisiala, A. Bioactive cytokinins are selectively secreted by Sinorhizobium meliloti nodulating and nonnodulating strains / A. Kisiala, C. Laffont, R. J. Emery, F. Frugier // Mol. Plant Microbe Interact. – 2013. – V. 26(10). – P. 1225–1231.

206. Van Zeijl, A. Rhizobium lipo-chitooligosaccharide signaling triggers accumulation of cytokinins in Medicago truncatula roots / A. Van Zeijl, R. H. Op den Camp, E. E. Deinum, T. Charnikhova, H. Franssen, H. J. Op den Camp, H.

Bouwmeester, W. Kohlen, T .Bisseling, R. Geurts // Mol. Plant. – 2015. – V. 8(8). – P. 1213–1226.

207. Леонова, Н. О. Синтез позаклітинних фітогормонів-стимуляторів бульбочковими та фітопатогенними бактеріями сої / Н. О. Леонова, Л. А. Данкевич, І. В. Драговоз, В. П. Патика, Г. О. Іутинська // Reports NAAS Ukraine. – 2013. - V. 3. - P. 165–171.

208. Архипова, Т. Н. Гормонпродуцирующие и рост-стимулирующие микроорганизмы снижают уровень оксидативного стресса у растений пшеницы на фоне засоления / Т. Н. Архипова, Л. Ю. Кузьмина, Г. Р. Кудоярова // Биомика. – 2018. – Т. 10, № 4. - С. 365-371.

209. Pertry, I. Rhodococcus fascians impacts plant development through the dynamic fasmediated production of a cytokinin mix / I. Pertry, K. Václavíková, M. Gemrotová, L. Spíchal, P. Galuszka, S. Depuydt, W. Temmerman, E. Stes, A. De Keyser, M. Riefler, S. Biondi, O. Novák, T. Schmülling, M. Strnad, P. Tarkowski, M. Holsters, D. Vereecke // Mol. Plant Microbe Interact. – 2010. – V. 23(9). - 1164–1174.

210. Rangaswamy, V. Improved production of gibberellic acid by Fusarium moniliforme / V. Rangaswamy // Journ. Microbiol. Res. – 2012. – V. 2(3). - P. 51–55.

211. Shi, T. Q. Microbial production of plant hormones: Opportunities and challenges. / T. Q. Shi, H. Peng, S. Y. Zeng, R. Y. Ji, K. Shi, H. Huang, X. J. Ji // Bioengineered. – 2017. – V. 8(2). – P. 124–128.

212. Khan, A. L. Endophytic fungi: resource for gibberellins and crop abiotic stress resistance / A. L. Khan, J. Hussain, A. Al-Harrasi, A. Al-Rawahi, I. Lee // Journ. Crit. Rev. Biotechnol. – 2015. – V. 35(1). - P. 62–74.

213. Jaroszuk-Ściseł, J. Efficiency of indoleacetic acid, gibberellic acid and ethylene synthesized in vitro by Fusarium culmorum strains with different effects on cereal growth. / J. Jaroszuk-Ściseł, E. Kurek, M. Trytek // Biologia. – 2014. – V. 69(3). - 281–292.

214. Vejan, P. Role of plant frowth promoting rhizobacteria in agri cultural sustainability — a review / P. Vejan, R. Abdullah, T. Khadiran, S. Ismail, Boyce Nasrulhaq // Molecules. – 2016. – V. -21(5). – P. 573.

215.Gopalakrishnan, S. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities / S. Gopalakrishnan, A. Sathya, R. Vijayabharathi, R. K. Varshney, C. L. Gowda,, L. Krishnamurthy // Biotech. – 2015. – V. 5(4). – P. 355–377.

216. Пирог, Т. П. Синтез фитогормонов бактериями Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241, Rhodococcus erythropolis IMB Ac-5017 И Nocardia vaccinii IMB B-7405 – продуцентами поверхностно-активных веществ / Т. П. Пирог, Н. О. Леонова, Т. А. Шевчук, И. В. Савенко, Г. А. Иутинская // Весці нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сер. Біял. Навук. – 2016. - № 1. - С. 90-95.

217. Чжан Данянь. Новые биотехнологические продукты для процессов бурения и добычи нефти: дис. … канд. техн. наук: 03.02.08 / Чжан Данянь. – 2011. - 167 с.

218. Микроорганизмы – продуценты биоПАВов / Мир знаний [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://mirznanii.com/a/326394-3/mikroorganizmy-produtsenty-biopavov-3 (дата обращения: 09.05.2019).

219. Биоремедиация, стимуляция роста, защита растений и забота об окружающей среде: возможности применения биосурфактантов / Life science. In progress. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://lsciinprogress.blogspot.com/2014/09/blog-post_27.html (дата обращения: 09.05.2019)

220.Мухаматдьярова, С. Р. Консорциум углеводородокисляющих микроорганизмов как основа биопрепарата для очистки отходов нефтеперерабатывающей промышленности: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Мухаматдьярова Светлана Ринатовна. - Уфа, 2016. - 28 с.

221. Логинова, О. О. Использование штаммов рода Acinetobacter для биоремедиации нефтезагрязненных почв на территории Воронежской

области / О. О. Логинова, Т. Т. Данг, Е. В. Белоусова, М. Ю. Грабович // Вестник ВГУ. - 2011. - № 2. – С. 127–133.

222. Lang, S. Surface-active lipids in rhodococci / S. Lang, J. C. Philp // Antonie van Leeuwenhoek. – 1998. - V. 74, no 1–3. – P. 59–70.

223. Ланге, К. Р. Поверхностно-активные вещества: синтез, свойства, анализ, применение / К. Р. Ланге. - СПб., 2007. - 240 с.

224.Мелентьев, А. И. Штамм бактерий B. subtilis - продуцент сурфактина / А. И. Мелентьев, Л. Ю. Кузьмина, О. В. Яковлева, В. П. Курченко Патент РФ 2270858. – Опубл. 27.02.2006.

225. Петриков, К. В. Биологические поверхностно-активные вещества, продуцируемые микроорганизмами-нефтедеструкторами родов Pseudomonas и Rhodococcus: автореф. дис. … канд. хим. наук: 03.01.06 / Петриков Кирилл Владимирович. – М., 2011. – 24 с.

226. Костина, Е. Г. Влияние условий культивирования на биосинтез полисахаридов культурой *Rhodococcus erythropolis* штамм ВКМ Ас-858Т / Е. Г. Костина, В. В. Ревин, Н. А. Атыкян, И. Н. Гоготов // IV Респ. науч.-практич. конф. «Наука и инновации в республике Мордовия». - Саранск, 2005 - С. 583-588.

227. Cooper, D. G. Surface-active agents from two Bacillus species / D. G. Cooper, B. G. Goldenberg // Appl. Environ. Microbiology. – 1987. – V. 53, no 2. – P. 224-229.

228. Biosurfactants: Definition, Classification, Production and Applications | Industrial Biotechnology / Bio technology [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.biotechnologynotes.com/industrial-biotechnology/biosurfactants/biosurfactants-definition-classification-production-and-applications-industrial-biotechnology/14024 (дата обращения: 10.05.2019).

229. Егоров, Н. С. Основы учения об антибиотиках: учебник. 6-е изд., перераб. и доп. / Н. С. Егоров. - М.: МГУ, Наука, 2004. - 528 с.

230. Berdy, J. Bioactive microbial metabolites / J. Berdy // Journ. Antibiot. - 2005. - V. 58, no 1. - P. 1-26.

231. Chin, Y.-W. Drug discovery from natural sources / Y.-W. Chin, M. J. Balunas, H. B. Chai, A. D. Kinghorn // AAPS Journ. - 2006. - V. 8, no 2. - P. 239-253.

232. Blunt, J. W. Marine natural products / J. W. Blunt, B. R. Copp, R. A. Keyzers, M. H. Munro, M. R. Prinsep // Nat. Prod. Rep. - 2016. - V. 33, no 3. - P. 382-431.

233. Berdy, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading / J. Berdy // Journ. Antibiot. - 2012. - V. 65. - P. 385-395.

234. Ефименко, Т. А. Бактериальные продуценты антибиотиков, активных в отношении микроорганизмов с лекарственной устойчивостью: автореф. дис. … канд. биол. наук: 14.03.07 / Ефименко Татьяна Александровна. - М., 2018. -17 с.

235. Ефименко, Т. А. Бактерии, выделенные из вечной мерзлоты Антарктики – эффективные продуценты антибиотиков / Т. А. Ефименко, О. В. Ефременкова, Е. В. Демкина, М. А. Петрова, И. Г. Сумарукова, Б. Ф. Васильева, Г. И. Эль-Регистан // Микробиология. – 2018. -Т. 87, № 5. - С. 573-580.

236. Берестецкий, А. О. Спектр биологической активности грибов рода Alternaria, выявленных в филлосфере травянистых растений / А. О. Берестецкий, Ф. Б. Ганнибал, Е. В. Минкович, И. А. Остерман, Д. Р. Салимова, П. В. Сергиев, С. В. Сокорнова // Микробиология. – 2018. - Т. 87, № 6. – С. 706-717.

237. Gasymova, G. A. Study of the antimicrobial activity of some xylotrophic macromycetes and prospects of these studies / G. A. Gasymova, T. I. Udovichenko // Modern science. – 2019. - no 7-1. - P. 9-10.

238. Стоянова, Л. Г. Выделение и идентификация молочнокислых бактерий Lactococcus lactis subsp. lactis с антимикробным действием / Л. Г. Стоянова // Изв. Тимирязевской сельскохозяйственной академию. – 2017. № 5. - С. 41-61.

239. Феоктистова, Н. В. Ризосферные бактерии / Н. В. Феоктистова, А. М. Марданова, Г. Ф. Хадиева, М. Р. Шарипова // Ученые записки Казанского ун-та. Сер. естественные науки. – 2016. – Т. 158. - № 2. - С. 207-224.

240. Функ, И. А. Биотехнологический потенциал бифидобактерий / И. А. Функ, А. Н. Иркитова // Acta Biol. Sibirica. – 2016. - Т. 2. - № 4. - С. 67-79.

241. Кузин, А. И. Изучение штамма Bacillus pumilus b-13176, метаболиты которого обладают фунгицидной и антибактериальной активностью в отношении Aspergillus niger и Staphylococcus aureus (MRSA) / А. И. Кузин, А. А. Тагаев, Т. В. Овчинникова, Н. И. Кузнецова, М. А. Николаенко, О. А. Морозова, Р. Р. Азизбекян // Биотехнология. – 2018. – Т. 34, № 3. – С. 23-32.

242. Садыкова, В. С. Экстремофильные грибы - продуценты антимикробных пептидов / В. С. Садыкова, А. А. Баранова, Е. А. Рогожин, М. Л. Георгиева, В. А. Алферова, Р. А. Габрия, Е. Н. Биланенко, А. Б. Кулько // Усп. медицинской микологии. - 2018. - Т. 19. – С. 211-214.

243. Кормилец, Д. Ю. Пептиды-антибиотики / Д. Ю. Кормилец, А. Д. Поляновский, В. А. Дадали, А. Т. Марьянович // Журн. эволюционной биохимии и физиологии. – 2019. - Т. 55. - № 4. – С. 242-248.

244. Веселова, М. А. Летучие вещества бактерий: структура, биосинтез, биологическая активность / М. А. Веселова, В. А. Плюта, И. А. Хмель // Микробиология. – 2019. – Т. 88, № 3. - С. 272-287.

245. Арчегова, И. Б. Способ получения органического удобрения / И. Б. Арчегова, М. Ю. Маркарова, О. В. Громова // Патент РФ 2094414. – Опубл. 1997.

246. Чудаков, М. И. Промышленное использование лигнина / М. И. Чудаков. - М.: Лесная пр-ть, 1983. - 213 с.

247. Lin, S. Y. Lignin utilization: potential and challenge / S. Y. Lin // Progress in Biomass Conversion. - 1983. - V. 4. - P. 31-78.

248. Lignin: Historical, biological and material perspectives / eds. by W. G. Glasser, R. A. Northey, T. P. Schultz. - Washington. - 1999. - 576 p.

248. Chemical modification, properties, and usage of lignin / ed. by T.Q. Hu. - N. Y., 2002. - 291 p.

250. Falkehag, I. Lignin recovery and utilization technologies / I. Falkehag // Int. Symp. Wood Pulp. Chem. Raleigh. - 1989. - V. 1. - P. 107-112.

251. Малькина, А. Г. Новые высокоэффективные сорбенты на основе лигнина / А. Г. Малькина, Л. В. Соколянская, В. Д. Цыханский, А. А. Татаринова, А. В. Гусаров, В. А. Хаматаев, Е. Ю. Фомина // Химия в интересах устойчивого развития. - 1996. - № 4. - С. 307-311.

252. Лиштван, И. И. Пиролиз биомассы и характеристика получаемых продуктов / И. И. Лиштван, В. М. Дударчик, В. М. Крайко, Е. В. Ануфриева, Е. А. Смолячкова // Природопользование. – 2015. - № 27. – С. 151-158.

253. Тарасов, А. Л. Способ переработки лигнина в жидкие углеводороды / А. Л. Тарасов, Л. М. Кустов // Патент РФ 2573405. - Опубл. 20.01.2016.

254. Решетников, В. И. Композиционный энтеросорбент и способ его приготовления / В. И. Решетников // Патент РФ 2234931. - Опубл. 27.08.2004.

255. Gosselink, R. J. A. Coordination network for lignin - standardization, production and applications adapted to market requirements (EUROLIGNIN) / R. J. A. Gosselink, E. Jong, B. Guran, A. Abacherli // Ind. Crops and Products. - 2004. - V. 20. P. 121-129.

256. Imam, S. H. Biobased adhesive, gums, emulsions, and binders: current trends and future prospects / S. H. Imam, C. Bilbao-Sainz, B.-S. Chiou // Journ. Adhes. Sci. Technol. - 2013. - V. 27, no. 18-19. - P. 1972-1997.

257. Морозов, Д. К. Использование мягких отходов лесопиления с целью производства топливных брикетов / Д. К. Морозов, И. В. Морозова, С. Б. Васильев // Resources and Technol. – 2018. - V. 15. no 3. P. 1-28.

258. Sotannde, O. A. Physical and combustion properties of briquettes from sawdust of Azadirachta indica / O. A. Sotannde, A. O. Oluyege, G. B. Abah // Journ. Forestry Research. - 2010. - No 21 (1). - P. 63-67.

259. Попов, А. Н. Исследование процесса производства древесных гранул с целью повышения эффективности их энергетического

использования: автореф. дис. … канд. техн. наук: 05.21.01 / Попов Анатолий Николаевич. - Архангельск, 2016. - 20 с.

260. Древесная мука – технология, оборудование, стоимость, рентабельность [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://biznesplan-primer.ru/proizvodstvo/muka/drevesnaya (дата обращения: 15.11.2019).

261. Шлегель, И. Ф. Вопросы переработки опилок / И. Ф. Шлегель, С. Г. Макаров // Строительные материалы. – 2017. - № 10. - С. 56-57.

262. Пашаян, А. А. Создание нефтепоглощающих сорбентов совместной утилизацией древесных опилок и нефтяных шламов / А. А. Пашаян, А. В. Нестеров // Вестник технол. ун-та. - 2017. – Т. 20, № 9. – С. 144-147.

263. Миертус, С. Технологии восстановления почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. Справочник / С. Миертус, Н. Ю. Гречищева, С. В. Мещеряков, Н. Г. Рыбальский, А. Р. Барсов – М.: РЭФИА, НИА-Природа, 2001. - 185 с.

264.Поташников, Ю.М. Утилизация отходов производства и потребления / Ю. М. Поташников. – Тверь.: Изд-во ТГТУ, 2004. – 107 с.

265. Подавалов, Ю. А. Экология нефтегазового производства / Ю. А. Подавалов. – М.: Инфра-Инженерия, 2010. – 416 с.

266. Незнамова Е. Г. Основы коррекции экологических ситуаций в трех средах / Е. Г. Незнамова. – Томск, 2007. – 154 с.

267. Лазарев, А. П. Совершенствование технологии рекультивации нефтезагрязненных земель с применением бульдозера-смесителя: автореф. дис. … канд. техн. наук: 06.01.02 / Лазарев Александр Петрович. – Саратов, 2014. – 18 с.

268. Mandri, T. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microrganisms in Kwazulu-Natal, South Africa / T. Mandri, J. Lin // African Journ. Biotechnol. - 2007. – V. 6(1). – P. 023–026.

269. Al-Majed, A. A., A sustainable approach to controlling oil spills / A. A. Al-Majed, A. R. Adebayo, M. E. Hossain // Journ. Environmen. Manag. - 2012. – V. 113. – P. 213.

270. Аренс, В. Ж. Очистка окружающей среды от углеводородных загрязнений / В. Ж. Аренс, А. З. Саушин, О. М. Гридин. – М.: Интербук, 1999. - 180 с.

271. Кузнецов, А. Е. Прикладная экобиотехнология: учебное пособие в 2 т.: / А. Е. Кузнецов, Н. Б. Градова, Н. Б. Лушников, М. Энгельхарт, Т. Вайссер, М. В. Чеботаева. - М. : БИНОМ, 2010. - Т. 2. - 485 с.

272. Бутырин, М. В. Динамика основных показателей плодородия пахотных почв Иркутской области / М. В. Бутырин, В. В. Штанцова // Земледелие. – 2017. - № 4. - С. 9-14.

273.Отчет Министерства сельского хозяйства Иркутской обл. - 2018. - С. 55.

274. Евдакова, М. В. Экологические проблемы применения минеральных удобрений при возделывании сельскохозяйственных культур / М. В. Евдакова // Экология и сельское хозяйство: на пути к инновациям. Матер. Междунар. научно-практ. конф. – Орел, 2019. - С. 110-115.

275. Александрова, Л. Н. Органическое вещество почвы и процессы его трансформации / Л. Н. Александрова. - Л.: Наука, 1980. - 287 с.

276. Азаркин, Н. М. Лигнин как источник органических удобрений / Н. М. Азаркин // Химия в сельском хозяйстве. - 1987. - № 9. - С. 76-77.

277. Применение органических удобрений в земледелии Хакасии (рекомендации) / Абакан: УПП «Хакасия», 1988. - 50 с.

278. Ильин, Н. И. Виды удобрений, их применение / Н. И. Ильин // Урожайные сотки. - 1998. - № 1. - С. 35-37.

279. Орлов, Д. С. Агроэкологические аспекты использования нетрадиционных органических удобрений на основе гидролизного лигнина / Д. С. Орлов, Я. М. Амосова, О. С. Якименко // Почвоведение. - 1993. - № 2. - С. 36-44.

280. Кузнецов, Б. К. Органоминеральное удобрение на основе гидролизного лигнина / Б. К. Кузнецов, Н. М. Завальнюк // Патент РФ 2209196. - Опубл. 27.07.2003.

281. Мигутин, Г. В. Способ получения органоминерального удобрения / Г. В. Мигутин, В. А. Алкарев, Н. В. Минобудинова, Л. Н. Сыркин // Патент РФ 2086522. - Опубл. 1992.

282. Смирнов, А. Н. Исследования аэробной переработки куриного помета со смесью хвойных и лиственных пород опилок / А. Н. Смирнов, Е. Б. Азина // Изв. Междунар. академии аграрного образования. – 2019. - № 45. – С. 61-64.

283. Лагутина, Т. Б. Влияние нетрадиционных органических удобрений на плодородие и агроресурсный потенциал аллювиальных дерновых почв Архангельской области / Т. Б. Лагутина, Л. А. Попова, Л. Н. Шалагинова // Агрохимический Вестник. - 2016. - № 4. - С. 19-22.

284. Коберник, А. И. Комплексное органоминеральное удобрение и способ его получения / А. И. Коберник, М. Н. Чертов, В. Н. Шалобало, Л. И. Осадчая, В. А. Таранушич // Патент РФ 2174971. – Опубл. 2001.

285. Трушкин, А. В. Лигнин в хлопководстве / А. В. Трушкин. - Ташкент: Мехнат, 1986. - 79 с.

286.Тен Хак Мун. Биопотенциальная способность лигнина в тяжелых дифференцированных почвах долины реки Амур / Тен Хак Мун, Г. В. Харитонова, Е. Л. Имранова // Геология и экология бассейна р. Амур. - Тез. докл. конф. - 1989. - С. 80.

287. Островская, Р. М. Лигнин и продукты его модификации как мутагенные и биостимулирующие соединения / Р. М. Островская, Л. Н. Новикова, В. А. Серышев // Матер. Юбилейной конф. «Современные проблемы экологии, природопользования и ресурсосбережения Прибайкалья». Иркутск. - 1998. - С. 67-69.

288. 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.

289. Король, Г. С. Способ получения органического удобрения / Г. С. Король, М. Л. Шакун, М. В. Рак, О. М. Горностай, И. А. Юшкевич, Ф. Ф. Можейко // Патент РФ 1638139. – Опубл. 1991.

290. Labrie, C. Effect of waste-based composts produced by two-phase composting on two oomycete plant pathogens / C. Labrie, P. Leclers, C. Beaulieu // Plant and soil. - 2001. - V. 235. - P. 27-34

291. Лясковский, М. И. Органоминеральное удобрение / М. И. Лясковский, К. Н. Овчинникова, Л. З. Назирова / Патент РФ. 2054404. – Опубл. 20.02.1996.

292. Лясковский, М. И. Влияние сложного органоминерального удобрения на основе гидролизного лигнина на рост и продуктивность овощных культур / М. И. Лясковский // Агрохимия. - 2003. - № 4. - С. 29-38.

293. Миронов, П. В. Микробиологическая конверсия отходов деревообработки с получением органических удобрений / П. В. Миронов, Е. В. Алаудинова, Р. Х. Эназаров, А. С. Саволайнен // Хвойные бореальной зоны. - 2018. Т. 36, № 3. - С. 275-278.

294. Фокин, Д. В. Участие микроорганизмов в трансформации гумуса почв / Д. В. Фокин, А. М. Дмитраков, О. А. Соколов // Агрохимия. - 1999. - № 9. - С. 79-90.

295. Shi, Chunzhi. Action nitrogen-fixed microorganisms on the contents of nitrogen in compost / Chunzhi Shi, Jitao Pu, Zongrun Zheng, Rui Li // Chin. Journ. Appl. Environ. Biol. - 2002. - V. 8, no 4. - P. 419-421.

296. Пилюгина, Л. Г. Способ получения органоминерального удобрения / Л. Г. Пилюгина, Г. М. Кураева // А. с. СССР № 1165674. – Опубл. 1985.

297. Харитонова, Г. В. Применение лигнина для повышения продуктивности луговых текстурно-дифференцированных почв Приамурья / Г. В. Харитонова, Н. М. Завальнюк, Е. Л. Имранова // Агрохимия. - 1997. - № 6. - С.43-49.

298. Chandra, S. Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon / S. Chandra, R. Sharma, K. Singh, A. Sharma // Ann. Microbiol. – 2013. – V. 63. - P. 417–431.

299.Чеботарев, Н. Т. Использование лигнопометного компоста для удобрения дерново-подзолистой почвы при выращивании многолетних трав / Н. Т. Чеботарев, И. Н. Хмелинин, В. М. Швецова // Агрохимия. - 2001. - № 5. - С. 33-37.

300. Чеботарев, Н. Т. Влияние пометнолигнинового компоста на свойства и продуктивность дерново-подзолистой почвы / Н. Т. Чеботарев, А. А. Юдин, Е. Н. Микушева // Аграрная наука. - 2018. - № 10. - С. 55-58.

301. Сюняев, Н. К. Новое органо-минеральное удобрение для выращивания масличного льна в условиях калужской области / Н. К. Сюняев, С. Л. Белопухов, И. И. Дмитревская, В. М. Лукомец // Агрохимия. - 2018 . -№ 12. – С. 26-30.

302. Белюченко, И. С. Применение сложных компостов для повышения плодородия почв / И. С. Белюченко // Экологический вестник Северного Кавказа. – 2016. – Т. 12. - № 1. - С. 55-69.

303. Долматов, С. Н. Перспективы применения компоста из древесных опилок / С. Н. Долматов // Аграрный научный журнал. - 2016. - № 3. - С. 49-51.

304. Арчегова, И. Б. Переработка гидролизного лигнина и получение на его основе материала для рекультивации техногенно-нарушенных территорий Крайнего Севера / И. Б. Арчегова, М. Ю. Маркарова, О. В. Громова // Химия в интересах устойчивого развития. - 1998. - Т. 6, № 4. - С. 303-309.

305. Романов, Е. М. Выращивание однолетних сеянцев дуба черешчатого (Quercus robur l.) с закрытой корневой системой на различных питательных субстратах / Е. М. Романов, М. И. Смышляева, В. Г. Краснов, Д. И. Мухортов // Вестник ПГТУ. - 2017. - № 3 (35). - С. 26-35.

306. Гродницкая, И. Д. Продукты биоконверсии древесных отходов хвойных в биоремедиации деградированных почв / И. Д. Гродницкая, Н. В. Пашенова, О. Э. Кондакова // Строение, свойства и качество древесины – 2018. Матер. VI Междунар. симпозиума им. Б. Н. Уголева, посвященного 50-летию Регионального Координационного совета по современным проблемам древесиноведения. - Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2018. – С. 68-71.

307. Трусова, Л. А. Влияние органических удобрений на урожайность и качество свеклы столовой и щавеля / Л. А. Трусова, Д. В. Петров // Изв. Санкт-Петербургского гос. аграрного ун-та. – 2017. - № 1 (46). – С. 52-58.

308. Байбеков, Р. Ф. Продуктивность сельскохозяйственных культур при использовании удобрений из органических отходов на дерново-подзолистых почвах / Р. Ф. Байбеков, Г. Е. Мерзлая, О. А. Власова // Достижения науки и техники АПК. - 2017. - Т. 31, № 9. - С. 29-33.

309. Zaki, M. S. Bioremediation of contaminants / M. S. Zaki, O. M. Fawzi, M. F. Abd EL-Zaher // Life Sci. Journ. - 2013. – V. 10(1). – P. 3329–3332.

310. Fukuhara, Y. Distribution of hydrocarbon-degrading bacteria in the soil environment and their contribution to bioremediation / Y. Fukuhara, S. Horii, T. Matsuno, Y. Matsumiya, M. Mukai, M. Kubo // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2013. – V. 170. – P. 329–339.

311. Shankar, S. Application of indigenous microbial consortia in bioremediation of oil-contaminated soils / S. Shankar, C. Kansrajh, M. G. Dinesh, R. S. Satyan, S. Kiruthika, A. Tharanipriya // Int. Journ. Environ. Sci. Technol. – 2014. - V. 11. – P. 367–376.

312. Thapa, B. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil / B. Thapa, A. K. C. Kumar, A. Ghimire // Kathmandu University Journ. Sci. Engineer. Technol. - 2012. - V. 8, no. 1, - P. 164-170.

313. Coulon, F. Multimedia fate of petroleum hydrocarbons in the soil. Oil matrix of constructed biopiles / F. Coulon, M. J. Whelan, G. I. Paton, K.T. Semple, R. Villa, S. J. T. Pollard // Chemosphere. - 2010. - V. 81(11). – P. 1454–1462.

314. Malik, Z. A. Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium / Z. A. Malik, S. Ahmed // African Journ. Biotechnol. – 2012. – V. 11(3). – P. 650–658.

315. Руденко, Е. Ю. Экологические основы биологической рекультивации нефтезагрязненных почв / Е. Ю. Руденко. – Самара: СамГТУ, 2012 . – С. 166.

316. Phlia, V. Technologies in aquatic bioremediation / V. Phlia, A. Jamwal, N. Saxena // Freshwater ecosystem and xenobiotics. – 2013. – V. 179. - P. 65-91.

317.Alwan, A. H. Bioremediation of the water contaminated by waste of hydrocarbon by use Ceratophyllaceae and Potamogetonaceae plants / A. H. Alwan, S. M. Fadil, S. H. Khadair, A.A. Haloub, D. B. Mohammed, M. F. Salah, S. S. Sabbar, N. K. Mousa, Z. A. Salah // Journ. Genet. Environ. Resour. Conserv. – 2013. – V. 1(2). – P. 106–110.

318. Xu, Y. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments / Y. Xu, M. Lu // Journ. Hazard. Mater. – 2010. - V. 183. - P. 395–401.

319. Tomei, M. C. *Ex situ* bioremediation of contaminated soils: An overview of conventional an innovative technologies / M. C. Tomei, A. J. Daugulis // Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. – 2013. – V. 43. - P. 2107–2139.

320. Angelucci D. M. *Ex situ* bioremediation of chlorophenol contaminated soil: Comparison of slurry and solid-phase bioreactors with the two-step polymer extraction–bioregeneration process / D. M. Angelucci, M. C. Tomei // Journ. Chem. Technol. Biotechnol. – 2016. - V. 91. - P. 1577–1584

321. Roy, A. S. Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study / A. S. Roy, R. Baruah, M. Borah, A.K. Singh, H. P. D. Boruah, N. Saikia, T. C. Bora // Intern. Biodeterior. Biodegrad. - 2014. – V. 94. - P. 79–89.

322. Татосян, М. Л. Влияние загрязнения нефтью и нефтепродуктами на биологическую активность чернозёмов / М. Л. Татосян, С. Н. Бодня, С. И.

Колесников // Экология и биология Юга России. Вып. II. – Ростов: ЦВВР, 2003. - С. 60-63.

323. Попов, А. И. Биологическая рекультивация буровых площадок в Ненецком АО / А. И. Попов // Антропогенная трансформация природной среды: Матер. Междунар. конф. – Пермь: Изд-во Пермского гос. ун-та, 2010. - Т. 3. – С. 245-247.

324. Марченко, М. Ю. Биоремедиация нефтезагрязненных почв / М. Ю. Марченко // Башкирский хим. журнал. – 2011. - Т. 18, № 4, - С. 191-197.

325. Hamdi, H. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions / H. Hamdi, S. Benzarti, L. Manusadžianas, I. Aoyama, N. Jedidi // Soil Biol. Biochem. – 2007. – V. 39. - P. 1926–1935.

326.Kauppi, S. Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: Comparison of biostimulation and bioaugmentation / S. Kauppi, A. Sinkkonen, M. Romantschuk // Int. Biodeter. Biodegr. – 2011. – V. 65. - P. 359–368.

327. Suja, F. Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations / F. Suja, Rahim F., M. R. Taha, N. Hambali, M. R. Razali, A. Khalid // Int. Biodeter. Biodegr. – 2014. – V. 90. - P. 115–122.

328. Khan, S. Plant – bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils / S. Khan, M. Afzal, , S. Iqbal, Q. M. Khan // Chemosphere. - 2013. – V. 90(4). – P. 1317–1332.

329. Pimmata, P. Comparative bioremediation of carbofuran contaminated soil by natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation / P. Pimmata, A. Reungsang, P. Plangklang // Int. Biodeter. Biodegr. – 2013. – V. 85. - P. 196–204.

330. Simarro, R. Assessment of the efficiency of in situ bioremediation techniques in a creosote polluted soil: Change in bacterial community / R. Simarro,

N. González, L. F. Bautista, M. C. Molina // Journ. Hazard. Mater. – 2013. – V. 262. P. 158–167.

331. Walls, W. D. Petroleum refining industry in China / W. D. Walls // Energy Policy. - 2010. – V. 38(5). – P. 2110–2115.

332. Ndimele, P. E. A review on the phytoremediation of petroleum hydrocarbon / P. E. Ndimele // Pakistan Journ. Biol. Sci. - 2010. – V. 13(15). – P. 715.

333. Dave, D. Remediation technologies for marine oil spills: a critical review and comparative analysis. / D. Dave, A. E. Ghaly // Amer. Journ. Environ. Sci. - 2011. – V. 7(5). P. 423.

334. Das, N. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview / N. Das, P. Chandran // Biotechnol. Res. Int. - 2011. - V. 2011. - Article ID 941810, 13 p.

335. Barrutia, O. Plant tolerance to diesel minimizes its impact on soil microbial characteristics during rhizoremediation of diesel-contaminated soils / O. Barrutia, C. Garbisu, L. Epelde, M. C. Sampedro, M. A. Goicolea, J. M. Becerril // Sci. Total Environ. – 2011. – V. 409(19). – P. 4087–4093.

336. Liu, X. Degradation of diesel-originated pollutants in wetlands by Scirpus triqueter and microorganisms / X. Liu, Z. Wang, X. Zhang, J. Wang, G. Xu, Z. Cao, C. Zhong, P. Su // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2011. – V. 74(7). P. 1967–1972.

337. Al-Baldawi, I. A. Phytodegradation of total petroleum hydrocarbon (TPH) in dieselcontaminated water using Scirpus grossus / I. A. Al-Baldawi,; Abdullah S. R. Sheikh, N. Anuar, F. Suja, I. Mushrifah // Ecol. Eng. - 2015. – V. 74. – P. 463–473.

338. Коршунова, Т. Ю. Микроорганизмы в ликвидации последствий нефтяного загрязнения (обзор) / Т. Ю. Коршунова, С. П. Четвериков, М. Д. Бакаева, Е. В. Кузина, Г. Ф. Рафикова, Д. В. Четверикова, О. Н. Логинов // Прикл. биохимия и микробиология. - 2019. – Т. 55, № 4. - С. 338-349.

339. ГОСТ 9.048-91 Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов. – М.: Государственный комитет СССР по стандартам, 1989. – 17 с.

340. Kirk, T. K. Influence of culture parameters on lignin metabolism by Phanerochaete chrysosporium / T. K. Kirk, E. Schultz, W. J. Connors, L. F. Lorenz, J. I. Zeikus // Arch. Microbiol. - 1978. - V. 117, № 3. - P. 277-285.

341. Коломиец, Э. И. Физиологические потребности Trichosporon cutaneum при выращивании на гидролизном лигнине / Э. И. Коломиец, Т. В. Романовская, Н. А. Здор // Микробиол. журн. (Киев). - 1990. - Т. 52, № 1. - С. 38-42.

342. McCarthy, A. J. Screening for lignin degrading actinomycetes and characterization of their activity against [^{14}C] lignin-labeled wheat lignocellulose / A. J. McCarthy, P. Broda // J. Gen. Microbiol. - 1984. - V. 130. - P. 2905-2913.

343. Волчатова, И. В. Изменение состава гидролизного лигнина в процессе компостирования / И. В. Волчатова, С. А. Медведева, Л. Ф. Коржова, Н. В. Рудых // Прикл. биохимия и микробиология. - 2000. - Т. 36, № 3. - С. 293-298.

344. Аринушкина, Е. В. Руководство по химическому анализу почв / Е. В. Аринушкина. - М.: Изд-во МГУ, 1970. - 487 с.

345. Хазиев, Ф. Х. Методы почвенной энзимологии / Ф. Х. Хазиев. - М.: Наука., 1990. - 189 с.

346. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д. Г. Звягинцева. - М.: Изд-во МГУ, 1991. - 304 с.

347. Федорец, Н. Г. Методика исследования почв урбанизированных территорий. / Н. Г. Федорец, М. В. Медведева. - Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2009. - 84 с.

348. Синицын, А. П. Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов / А. П. Синицын, А. В. Гусаков, В. М. Черноглазов // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. - М., 1990. - Т. 25. - 150 с.

349. Доспехов, Б. А. Методика полевого опыта / Б. А. Доспехов. - М.: Агропромиздат., 1985. - 351 с.

350. Kawai, S. Degradation mechanisms of phenolic beta-1 lignin substructure model compounds by laccase of Coriolus versicolor. / S. Kawai, T. Umezawa, T. Higuchi // Arch. Biochem. and Biophys. - 1988. - V. 262, № 1. - P. 99-110.

351. Tien, M. Lignin-degrading enzyme from Phanerochaete chrysosporium: purification, characterization and catalytic properties of a unique H2O2 – requiring oxygenase / M. Tien, T. K. Kirk // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 1984. - V. 81, № 8. - P. 2280-2284.

352. Asada, Y. NADH-oxidazing peroxidase produced by lignin-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium / Y. Asada, M. Miyabe, M. Kikkawa, H. Kuwakara // J. Ferment. Technol. - 1987. - V. 65, № 4. - P. 483-487.

353. Методы экспериментальной микологии / Под ред. В. И. Билай. - Киев: Наукова думка, 1982. - 550 с.

354. ГОСТ 26423-85 Почвы. Методы определения удельной электрической проводимости, pH и плотного остатка водной вытяжки. – М.: Государственный комитет СССР по стандартам, 1986. – 4 с.

355. ГОСТ 26715-85 Удобрения органические. Методы определения общего азота. – М. : Государственный комитет СССР по стандартам, 1985. – 12 с.

356. ГОСТ 26717-85 Удобрения органические. Метод определения общего фосфора. – М. : Государственный комитет СССР по стандартам, 1986. – 6 с.

357. ГОСТ 26718-85 Удобрения органические. Метод определения общего калия. – М.: Государственный комитет СССР по стандартам, 1988. – 8 с.

358.ГОСТ 27894.5-88 Торф и продукты его переработки для сельского хозяйства. Методы определения подвижных форм фосфора. – М.: Государственный комитет СССР по стандартам, 1988. – 10 с.

359. ГОСТ 27894.3-88 Торф и продукты его переработки для сельского хозяйства. Методы определения аммиачного азота. – М.: Государственный комитет СССР по стандартам, 1988. – 8 с.

360. Агрохимические методы исследования почв. Руководство для полевых и лабораторных исследований / под ред. А. В. Соколова. - М.: Изд-во Академии наук СССР, 1960. - 555 с.

361. ГОСТ 9517-76 Угли бурые и каменные. Методы определения выхода гуминовых кислот – М.: Государственный комитет СССР по стандартам, 1977. – 5 с.

362. ГОСТ 27821-88 Почвы. Определение суммы поглощенных оснований по методу Каппена – М.: Государственный комитет СССР по стандартам, 1990. – 5 с.

363. ГОСТ 17.4.4.01-84 Охрана природы (ССОП). Почвы. Методы определения емкости катионного обмена – М.: Государственный комитет СССР по стандартам, 1985. – 6 с.

364. ГОСТ 26212-91 Почвы. Определение гидролитической кислотности по методу Каппена в модификации ЦИНАО – М.: Комитет стандартизации и метрологии СССР, 1993. – 5 с.

365. ГОСТ Р 54650-2011 Почвы. Определение подвижных соединений фосфора и калия по методу Кирсанова в модификации ЦИНАО. М.: Стандартинформ, 2013 – 5 с.

366. ГОСТ 26488-85. Почвы. Определение нитратов по методу ЦИНАО – М.: Государственный комитет СССР по стандартам, 1985. – 4 с.

367. ГОСТ 26213-91 Почвы. Методы определения органического вещества –1993-01-07. – М.: Издательство стандартов, 1992. – 8 с.

368. ГОСТ 26483-85. Почвы. Приготовление солевой вытяжки и определение ее pH по методу ЦИНАО – М.: Государственный комитет СССР по стандартам, 1985. – 6 с.

369. ГОСТ 13496.4-93 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения содержания азота и сырого протеина – М.: Госстандарт России, 2011. – 17 с.

370. ГОСТ 26657-97 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения содержания фосфора – М.: Госстандарт России, 1997. – 10 с.

371. ГОСТ 30504-97 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Пламенно-фотометрический метод определения содержания калия – М.: Госстандарт России, 1997. – 8 с.

372. ГОСТ 26176-91 Корма, комбикорма. Методы определения растворимых и легкогидролизуемых углеводов – М.: Комитет стандартизации метрологии СССР, 1991. – 9 с.

373. ГОСТ 30502-97 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Атомно-абсорбционный метод определения содержания магния – М.: Госстандарт России. 1998. – 8 с.

374. ГОСТ 13396.19-93 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения содержания нитратов и нитритов – М.: Госстандарт России, 2011. – 9 с.

375. Маркова, Ю. А. Полигостальность условно-патогенных энтеробактерий на модели их взаимодействия с растениями: автореф. дис. … д-ра биол. наук: 03.02.03 / Маркова Юлия Александровна. - Иркутск, 2013. - 42 с.

376. Другов, Ю. С. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов. Практическое руководство, 2-е изд., перераб. и доп. / Ю. С. Другов, А. А. Родин. - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. - 270 с.

377. Канарская, З. А. Биоконверсия сточных вод производства бумаги с получением бактриальных полисахаридных энтеросорбентов микотоксинов / З. А. Канарская, А. В. Канарский, Д. А. Дулькин, Э. И. Семенов, В. К. Чеботарь, А. В. Щербаков // Вестник Казанского технол. ун-та. – 2012. - Т. 14. - С. 186 - 190.

378. [Электронный ресурс]. Режим доступа: blast.ncbi.nlm.nih.gov

379. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://rdp.cme.msu.edu/seqmatch

380. Воробьева, Л. А. Химический анализ почв / Л. А. Воробьева. – М.: Изд-во МГУ, 1998. – 272 с.

381. Пуртова, Л. Н. Эмиссия CO_2 из почв природных ландшафтов Юга Приморья. / Л. Н. Пуртова, Н. М. Костенков // Вестник КрасГАУ. - 2013. – Т. 10. – С. 64-68.

382. Шлык, А. А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев / А. А. Шлык // Биохимические методы в физиологии растений. - М.: Наука, 1971. - С. 154–169.

383. Хабибуллина, Ф. М. Оценка углеводородокисляющей активности микроорганизмов / Ф. М. Хабибуллина, А. А. Шубаков, И. Б. Арчегова, Г. Г. Романов // Биотехнология. - 2002. - № 6. – С. 57-62.

384. Чумаков, М. И. Новый ассоциативный диазотроф Agrobacterium radiobacter из гистосферы пшеницы / М. И. Чумаков, В. В. Горбань, Л. Е. Ковлер, Г. К. Соловова, Ю. В. Кривопалов, А. Ю. Васильев, В. Д. Фролова, Е. М. Муронец, С. В. Каменева // Микробиология. - 1992. - Т. 61, № 1. С. 92-102.

385. Методы определения фитогормонов и фенолов в семенах / Отв. ред. М. Г. Николаева. – Л.: Наука. Ленингр. отд-ние, 1979. - 80 с.

386. Методы определения фитогормонов и фенолов в семенах / под ред. М. Г. Николаевой. - Л.: Наука, 1979. - 78 с.

387. Willumsen, P. A. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers / P. A. Willumsen, U. Karlson // Bio-degradation. - 1997. - V.7. - P. 415-423.

388. Ягофарова, А. Я. Выделение биосурфактантов из супернатанта штаммов микроорганизмов Bacillus thuringiensis, Dietzia maris / А. Я. Ягофарова, Н. Б. Молдагулова, К. Т. Муканова, Д. Б. Канаев, А. Б Курманбаева, Э. Ж. Хасенова // Биотехнология. Теория и практика. - 2012. № 4. - С. 30 - 33.

389. Серебрякова, Е. В. Оценка гидрофобных свойств бактериальных клеток по адсорбции на поверхности капель хлороформа / Е. В. Серебрякова, И. В. Дармов, Н. П. Медведев, С. А. Алексеев, С. И. Рыбак // Микробиология. - 2002. – Т. 71. № 2. –С. 237-239.

390. Ягофарова, А. Я. Изучение состава и свойств микробных ПАВ / А. Я. Ягофарова, К. Т. Бердимуратова, Э. Ж. Хасенова, Н. Б. Молдагулова // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2014. - № 9. – С. 39-42.

391. Решедько, Г. К. Особенности определения чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом / Г. К. Решедько, О. У. Стецюк // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2001. - Т. 3, № 4. - С. 348.

392. 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.

393. Волчатова, И. В. Микробиологическое и биохимическое исследование лигнокомпоста в процессе созревания / И. В. Волчатова, Л. А. Беловежец, С. А. Медведева // Микробиология. - 2002. - Т. 71, № 4. - С. 545-549.

394. Рабинович, М. Л. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов / М. Л. Рабинович, А. В. Болобова, В. И. Кондращенко // Древесина и разрушающие ее грибы. Кн. 1. - М.: Наука, 2001. - 264 с.

395. Саловарова, В. П. Ферментативная активность мицелиальных грибов, вызы-вающих деградацию лигноцеллюлозных субстратов / В. П. Саловарова // Тез. докл. рег. науч.-практ. конф. «Биоразнообразие микроорганизмов Восточно-Сибирского региона и их научно-практическое использование». - Иркутск. 1999. - С. 73-74.

396. Wariishi, H. In Vitro Depolymerization of Lignin by Manganese Peroxidase of Phanerochaete chrysosporium. / H. Wariishi, K. Valli, M. H. Gold // Biochem. Biophys. Research Commun. - 1991. V. 176, no 1. - P. 269-275.

397. 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.

398. Волчатова, И. В. Способ получения органо-минерального удобрения / И. В. Волчатова, С. А. Медведева, Э. И. Коломиец, А. Г. Лобанок // Патент РФ № 2192403. -2002. - Бюл. № 31.

399. Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем / под ред. М. А. Глазовской. - М.: Наука, 1988. – 264 с.

400. Shankar, S. Application of indigenous microbial consortia in bioremediation of oil-contaminated soils. / S. Shankar, C. Kansrajh, M. G. Dinesh, R. S. Satyan, S.Kiruthika, A. Tharanipriya // Int. Journ. Environ. Sci. Technol. – 2014. - V. 11. – P. 367–376.

401. Ouyang, W. Comparison of bio-augmentation and composting for remediation of oily sludge: a field-scale study in China / W. Ouyang, H. Liu, V. Murygina, Y. Yu, Z. Xiu, S. Kalyuzhnyi // Process Biochem. – 2005. V. 40(12). – P. 3763–3768.

402. Trindade, P. V. O. Bioremediation of a Weathered and Recently Oil Contaminated Soils from Brazil - A Comparison Study / P. V. O. Trindade, L. G. F. Sobral //Chemosphere. - 2005. - V. 58, no 4. - P. 515-522.

403. Zhuang, X. New Advances in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Bioremediation / X. Zhuang // Environ.Int. – 2007. – V. 33. – P. 406-413.

404. Omirbekova, A. A. Biodiversity of plants rhizosphere and rhizoplane bacteria in the presence of petroleum hydrocarbons / A. A. Omirbekova, T. Murasheva, R. Sydykbekova, L. Ignatova, R. Berzhanova // Intern. Conf. Environ., Biol. Ecolog. Sci. Engineer. - 2014. –P. 1647-1648.

405. Niem, Wang Y. Yu. J. Understanding plant-microbe internations for phytoremediation of petroleum- polluted soil / Wang Y. Yu. J. Niem, M. Xiao // PLoS ONE. - 2011. - V. 6 (3). - P. 1-8.

406. Пунтус, И. Ф. Деградация фенантрена бактериями родов Pseudomonas и Burkholderia в модельной почве / И. Ф. Пунтус, А. Е. Филонов, Л. И. Ахметов, А. В. Карпов, А. М. Боронин // Микробиология. - 2008. - Т. 77, № 1. - С. 11–20.

407. Patel, R. N. Immunological comparison of enzymes of the β-ketoadipate pathway / R. N. Patel, R. B. Meagher, L. N. Ornston // Journ. Biol. Chem. - 1974. - V. 249, no 23. - P. 7410–7419.

408. Krishnan, S. o-Phthalic acid, a dead-end product in one of the two pathways of phenanthrene degradation in Pseudomonas sp. strain PP2. / S. Krishnan, Y. Prabhu, P. S. Phale // Indian Journ. Biochem. Biophys. - 2004. - V. 41, no 5. - P. 227–232.

409. Belovezhets, L.A. Use of rhizosphere microorganisms for bioremediation of oil contaminated soils / L. A. Belovezhets, M. S. Tretyakova, Yu. A. Markova, A. A. Levchuk // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science.– 2020. - V. 408 (012086). doi:10.1088/1755-1315/408/1/012086

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

411. Бабошин, М. А. Микробная трансформация фенантрена и антрацена / М. А. Бабошин, Б. П. Баскунов, З. И. Финкельштейн, Е. Л. Головлев, Л. А. Головлева // Микробиология. - 2005. - №3. – С. 357-364.

412. Evans, W. C. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil Pseudomonads / W. C. Evans, H. N. Fcrnley, E. Griffits // Biochem. Journ. – 1965. – Vol. 98. – P. 819-831.

413. Kiyohara, H. Degradation of phenanthrene through o-phthalate by an Aeromonas sp. / H. Kiyohara, K. Nagao, R. Nomi // Agricult. Biolog. Chem. – 1976. – V. 40. – P. 1075-1082.

414.Samanta, S. K. Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphtol / S. K. Samanta, A. K. Chakrabarty, R. K. Jain // Applied Microbiol. Biotechnol. – 1999. – V. 53. – P. 98-107.

415. Moody, J. D. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspension of Mycobacterium sp. strain PYR-1 / J. D. Moody, J. P. Freeman, D. R. Doerge, C. E. Cerniglia // Applied Environ. Microbiol. – 2001. – V. – 67. – P. 1467-1483.

416. Белимов. А. А. Взаимодействие ассоциативных бактерий и растений в зависимости от биотических и абиотических факторов: автореф. дис. … д-ра биол. наук: 3.00.07 / Белимов Андрей Алексеевич. - СПб, 2008. - 46 с.

417. Котляров, Д. В. Физиологически активные вещества в агротехнологиях / Д. В. Котляров, В. В. Котляров, Ю. П. Федулов. - Краснодар: Изд-во Кубанского гос. аграрного университета им. И. Т. Трубилина, 2016. – 224 с.

418. 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 // Агрохимия. – 2017. - № 12. - С. 46–51.

419. Tretyakova, M. S. Possible use of oil-degrading microorganisms for protection of plant 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.

420. Koul, V. Sphere of influence of indole acid and nitric oxide in bacteria / V. Koul, A. Adholeya, M. Kochar // J. Basic Microbiol. - 2015. -V. 55, no 5. - P. 543-553.

421. Бабич, Т. Л. Деградация тяжелой нефти мезофильными и термофильными бактериями, образующими биосурфактанты / Т. Л. Бабич, Д.

Ш. Соколова, Назина Т. Н. // Биотехнологии в комплексном развитии регионов. Матер. Междунар. науч.-практ. конф. М. - 2016. - С. 101-102.

422. Ефремов, Н. А. Культивирование культуры Candida lipolytica на углеводородсодержащих субстратах и влияние источника питания на выход биосурфактанта / Н. А. Ефремов, В. С. Никитина, Н. Д. Рябцева, М. И. Абдуллин // Нефтегазопереработка – 2015. Мат. Междунар. науч.-практ. конф. - Уфа.- 2015. - С. 207-208.

423. Кононова, В. В. Сурфактантобразующая микрофлора: свойства и практическое использование / Кононова В. В., Самсонова А. С., Семочкина Н. Ф. // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Сб. науч. трудов ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси». - 2007. - С. 350-365.

424. Plant Pathology / Ed. G. N. Agrios. N.-Y.: Acad. Press., 1997. - 635 p.

425. Abbamondi, G. R. Plant growth-promoting effects of rhizospheric and endophytic bacteria associated with different tomato cultivars and new tomato hybrids / G. R. Abbamondi, G. Tommonaro, N. Weyens, S. Thijs, W. Sillen, P. Gkorezis, C. Iodice, W. M. Rangel, B. Nicolaus, J. Vangronsveld // Chem. Biol. Technol. in Agriculture.- 2016. – V. 3(1). - P. 1-10.

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

427. Асабина, Е. А. Исследование оптимальных условий культивирования бактерий рода *Pseudomonas* - продуцентов биологически активных веществ: автореф. дис. … канд. биол. наук: 03.00.23 / Асабина Елена Антоновна. - Уфа, 2009. - 23 с.

428. Иванкин, А. Н. О механизме биостимулирования и активации развития растительных культур / А. Н Иванкин, С. Б. Васильев, М. И. Бабурина, Н. Л. Вострикова, И. В. Козырев, Т. М. Миттельштейн, Т. В. Мишугина // Лесной вестник. – 2018. - Т. 22, № 5. – С. 5-13.

429. 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.

430. Омецинский, П. И. Способ получения субстрата для выращивания растений / П. И. Омецинский, А. М. Абрамец, Г. Ф. Кострома, А. И. Сорокин // А.с. СССР № 1411323. – Опубл. 1988.

431. 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.

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

433. Возняковская, Ю. М. Влияние микробных метаболитов и гиббереллина на некоторые стороны обмена веществ кукурузы / Ю. М. Возняковская, У. С. Нуржанов // Физиология растений. - 1965. - Т. 12, вып. 4. - С. 714-720.

434.Коломиец, Э. И., Антагонистическая активность Actinomyces flavescens при совместном культивировании с микроорганизмами различных таксономических групп / Э. И. Коломиец, Н. А. Здор, А. Г. Лобанок, Т. В. Романовская // Прикл. биохимия и микробиология. - 1997. - Т. 33, № 2. - С. 202-205.

435. Якушкина, Н. И. Физиология растений / Н. И. Якушкина. - М.: Просвещение, 1993. - 335 с.

436. Поляк, Ю. М. Выделение почвенных стрептомицетов - продуцентов комплексных антибиотиков / Ю. М. Поляк, В. И. Сухаревич // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю. А. Овчинникова. - 2017. – Т.13, № 1. - С. 18-24.

437. Ефременкова, О. В. Антибиотики базидиальных грибов / О. В. Ефременкова // Успехи медицинской микологии. – 2018. - Т. 18. – С. 240-245.

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

439. Имранова, Е. Л. Сукцессия микроорганизмов при деструкции древесных остатков: дис. … канд. биол. наук: 03.00.16 / Имранова Елена Львовна. - Хабаровск. - 1998. - 138 с.

440.Борцова, О. А. Динамика активности гидролитических и монооксигеназных целлюлаз в процессе ферментирования смесей растительных остатков и отработанного почвенного субстрата / О. А. Борцова, В. И. Дубовицкая, В. Е. Вертебный, Ю. В. Хомяков, Г. Г. Панова, А. С. Галушко // Агрофизика. – 2018. - № 4. – С. 17-23.

441. Бирюков, К. Н. Динамика численности микроорганизмов в органических отходах животноводства в процессе их активного компостирования / К. Н. Бирюков // Ветеринария. – 2017. -№ 3. С. 51-54.

442.Васильев, Э. В. Результаты экспериментальных исследований процесса пассивного компостирования / Э. В. Васильев // Технологии и технические средства механизированного производства продукции растениеводства и животноводства. - 2015. - № 86. - С. 112-118.

443. McKinley, V. L. Microbial activity in composting: part I. / V. L. McKinley, J. R. Vestal, A. E. Eralp // Biocycle. – 1985. – V. 26. – P. 39-43.

444. Сибагатуллин, Ф. С. Перспективность применения различных коммерческих препаратов для ускорения процесса "созревания" куриного помета / Ф. С. Сибагатуллин, З. М. Халиуллина, А. М. Петров, К. О. Синяшин // Вестник Казанского гос. аграрного ун-та. - 2019. - Т.14. - № 1 (52). - С. 53-57.

445. Ушакова, Н. А. Особенности биоконверсии органических отходов личинками мухи Hermetia illucens (diptera: stratiomyidae, linnaeus, 1758 / Н. А. Ушакова, А. И. Бастраков, В. П. Карагодин, Д. С. Павлов // Успехи современной биологии. - 2018. - Т. 138, № 2. - С. 172-182.

446. Ириков, О. В. Способ получения биогумуса посредством переработки куриного помета гибридом красного калифорнийского дождевого червя / О. В. Ириков, П. А. Попов Патент РФ 2422414. - Опубл. 27.06.2011.

447. Агрохимические свойства торфа [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://big-archive.ru/biology/the_peat_bogs_of_Russian_forest-steppe/31.php (дата обращения: 29.10.2019.

448. Eneji, A. E. Physico-chemical changes in livestock feces during composting / A. E. Eneji, Yamamoto Sadahiro, Honna Toshimasa, Ishiguro Akihiro // Commun. Soil Sci. Plant Anal. - 2001. - V. 32, № 3-4. - P. 477-289.

449. Волчатова, И. В. Исследование свойств органо-минерального удобрения на основе гидролизного лигнина / И. В. Волчатова, С. А. Медведева, Л. Н. Новикова, В. А. Серышев // Агрохимия. - 2000. - № 12. - С. 53-57.

450. Правкина, С. Д. Способ получения органоминерального удобрения из осадков сточных вод с помощью компостирования / С. Д. Правкина, А. В. Карякин, В. И. Левин, Т. В. Хабарова // Патент РФ 2 489 414. - Опубл. 2013.

451. Mata, G. Extracellular enzyme activities in six Lentinula edodes strains during cultivation in wheat straw / G. Mata, J. M. Savoie // World J. Microbiol. Biotechnol. - 1998. - V. 14. - P. 513-519.

452. Smith, D. Changes in maturity indicators during the degradation of organic wastes subjected to simple composting procedures / D.Smith, J. Hughes // Biology and Fertility of Soils. – 2004. – V. 39. - № 4. – P. 280-286(7).

453. 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

454. Глухих, М. А. Динамика емкости катионного обмена почв Зауралья / М. А. Глухих, А. А. Калганов, Т. С. Калганова // АПК России. - 2016. - Т. 23, № 5. - С. 909-917.

455. Яковлева, Л. В. Ионообменная способность и миграция веществ в дерново-подзолистых пахотных почвах / Л. В. Яковлева, Е. А. Николаева // Вестник Брянской гос. сельскохозяйственной академии. - 2018. - № 5 (69). - С. 15-20.

456. 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.

457. Тен Хак Мун. Влияние компостной закваски на ускорение компостирования органических веществ / Тен Хак Мун, Чень Вань Фен, Е. Л. Имранова, О. А. Кириенко, Г. Н. Ганин // Агрохимия. - 2004. - № 2. - С. 63-66.

458. Полянскова, Е. А. Экологическая оценка серых лесных и черноземных почв различной степени загрязнения нефтью: автореф. дис. … канд. биол. наук: 03.02.08 / Полянскова Екатерина Александровна. – Пенза. - 2011. – 22 с.

459. Гузев, В. С. Перспективы эколого-микробиологической экспертизы состояния почв при антропогенных воздействиях / В. С. Гузев, С. В. Левин // Почвоведение. – 1991. - № 9. – С. 50-61.

460. Исакова, Е. А. Особенности воздействия нефти и нефтепродуктов на почвенную биоту / Е. А. Исакова // Colloquium-Journ. – 2019. - 12-1 (36). – С. 4-6.

461. Турусов, В. И. Влияние физических свойств черноземных почв на активность почвенных ферментов / В. И. Турусов, Ю. И. Чевердин, Т. В. Титова, В. А. Беспалов // Международный журнал гуманитарных и естественных наук. - 2019. № 4-1. - С. 15-18.

462. Берсенева, О. А. Исследование эффективности применения природных мелиорантов в загрязненной фторидом натрия почве посредством анализа активности почвенных ферментов / О. А. Берсенева // Вестник Марийского гос. ун-та. Сер. Сельскохозяйственные науки. Экономические науки. - 2016. - № 3 (7). - С. 5-10.

463. Avneesh, D. S. Optimizatoin of extraction of bulk enzymes from spent mushroom compost / D. S. Avneesh, A. Noorlidah, S. Vikeneswary // J. Chem. Technology & Bio-technol. - 2003. - V. 78, no 7. - P. 743-752.

464. Низова, А. А. Активность сахаразы в дерново-подзолистой почве разных угодий / А. А. Низова // Сб. докл. Симпозиума по ферментам почвы. - Минск: Наука и техника, 1968. - С. 190-197.

465. Телышева, Г. М. Удобрения на основе лигнина. / Г. М. Телышева, Р. Е. Панкова. - Рига: Зинатне, 1978. - 64 с.

466. 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.

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

468. Колесников, С. И. Биодиагностика устойчивости бурых лесных почв западного Кавказа к загрязнению тяжелыми металлами, нефтью и нефтепродуктами / С. И. Колесников, К. Ш. Казеев, Р. К. Татлок, З. Р. Тлехас, Т. В. Денисова, Е. В. Даденко // Сибирский экологический журн. - 2014. - Т. 21, № 3. - С. 493-500.

469. Булуктаев, А. А. Фитотоксичность и ферментативная активность почв калмыкии при нефтяном загрязнении / А. А. Булуктаев // Юг России: экология, развитие. – 2017. – Т. 12, № 4.- С. 147-156.

470. Кислицина, М. Н. Ответные реакции Lemna minor L. на действие экзогенных фенольных соединений / М. Н. Кислицина, Г. Г. Борисова // Ученые записки Петрозаводского гос. ун-та. – 2016. - 4 (157). - С. 54-58.

471. Sreeramulu, N. Changes in endogenous growth regulation compounds during the after-ripening of the dormant seeds of groundnut / N. Sreeramulu // Z. Pflanz. - 1974. – V. 71, № 2. - P. 101-107.

472. Морозова, Э. В. Определение содержания природных ингибиторов роста клубней картофеля – кофейной кислоты и скополетина / Э. В. Морозова, Н. П. Кораблева, Л. В. Метлицкий // Прикл. биохим. и микробиол. - 1974. - Т. 10, вып. 3. - С. 477-481.

473. Возняковская, Ю. М. Микрофлора растений и урожай / Ю. М. Возняковская. - Л.: Колос, 1969. - 240 с.

474. Сергеева, Д. В. Сравнительный анализ предпосевной обработки семян подсолнечника различными нефтепродуктами / Д. В. Сергеева, П. П. Пурыгин // Бутлеровские сообщения. – 2018. – Т. 56, № 11. - С. 166-169.

475. Ахмадиев, М. В. Оценка интенсивности дыхания нефтезагрязненных почв / М. В. Ахмадиев // Прикл. экология. Урбанистика. – 2014 / - № 4. – С. 165-176.

476. Благодатская, Е. В. Активность и биомасса почвенных микроорганизмов в изменяющихся условиях окружающей среды / Е. В. Благодатская, М. В. Семенов, А. В. Якушев. - М.: Т-во науч. изд. КМК, 2016. – 243 с.

477. Поварова, Л. В. Анализ применения биотехнологий для очистки различных загрязнений окружающей среды / Л. В. Поварова // Наука. Техника. Технологии (Политехнический вестник). – 2019. - № 1. - С. 190-206.

478. Рабинович, Г. Ю. Научные основы, опыт продвижения и перспективы биотехнологических разработок / Г. Ю. Рабинович. - Тверь: Изд-во Тверского гос. ун-та, 2016. – 196 с.

479. Хаймулдинова, А. К. Экологически безопасные и экономически обоснованные методы очистки загрязненных почв / А. К. Хаймулдинова, И. Б. Фахрудинова, А. А. Алибекова // Вестник университета Туран. - 2016. - № 3 (71). - С.71-74.

480. Беловежец, Л. А. Способ утилизации древесных опилок с применением композиции дереворазрушающих микроорганизмов для получения комплексного органо-минерального удобрения / Л. А. Беловежец // Патент РФ 2 701 942. – Опубл. 2019.

481. Бутырин, М. В. Рекомендации по поддержанию плодородию почв в условиях Иркутской области / М. В. Бутырин // Агрофакт. – 2016. - № 5. - С. 5-13.

482. Подколзин, О. А. Мониторинг плодородия почв земель Краснодарского края / О. А. Подколзин, И. В. Соколова, А. В. Осипов, В. Н. Слюсарев // Труды Кубанского гос. аграрного ун-та. – Краснодар. – 2017. – Т. 68. - С. 117-124.

483. Руководство по санитарно-химическому исследованию почвы. М., 1993. - 159 с.

484. Беловежец, Л. А. Микробный препарат для биоремедиации почвы, загрязненной нефтью и нефтепродуктами / Л. А. Беловежец, М. С. Третьякова, Ю. А. Маркова // Патент РФ 2705290. – Опубл. 2019.

Приложение 1 Акты промышленных испытаний

АКТ
промышленных испытаний разработанного в ИрИХ СО РАН способа ускоренного компостирования древесных опилок

25.10.2008 г. пос. Советский

Испытания проводились в период с 12.06.2008 г. по 12.10.2008 г. на базе лесопилки (производительность 30 т. опилок в месяц), принадлежащей ООО «Компания «Северный лес», и расположенной по адресу: Архангельская область, Устьянский район, пос. Советский

Закладку 20 т свежих осиновых опилок проводили 12.06.2008 на открытой площадке, очищенной от растительности. Температура воздуха + 4 °С. Опилки обрабатывали 80 кг доломитовой муки, вносимой вручную с перемешиванием мотокультиватором. К смеси добавляли воду до достижения влажности 60-65 % и оставляли на двое суток для нейтрализации. Затем вручную вносили минеральные добавки: нитроаммофоску (N/P/K 17/17/15) - 8 кг/т и мочевину - 8 кг/т, а также заранее приготовленную композицию микроорганизмов *Acremonium* sp., *Phanerochaete chrysosporium* Burds. 1 MR-1, *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Pilat, , *Phanerochaete chrysosporium* Burds. ATCC-24725, *Sporotrichum pulverulentum*, стерильно высушенную на цеолите (размер гранул 3-5 мм); смесь перемешивали трактором. Формирование бурта проводили трактором с ножом. Температуру измеряли ежедневно в течение первой недели компостирования.

Перемешивание созревающего компоста проводили через 5, 10, 14 недель компостирования путем перемещения слоев бурта при помощи трактора. При первом перемешивании вручную вносили 80 кг доломитовой муки для поддержания оптимальной кислотности субстрата.

Через 4 мес. компостирования (12.10.2008 г.) отбирали пробы на анализ с глубины 0-10, 20-30, 50-60 см в 20 точках по всему периметру бурта и усредняли. Масса средней пробы составила 2 кг.

Испытания проводили:

От ООО «Компания «Северный лес» А.П. Буторин

От ИрИХ СО РАН:

м.н.с., к.б.н. Л.А. Беловежец

Генеральный директор
ООО «Компания «Северный лес» А.В. Третьяков

АКТ
промышленных испытаний разработанного в ИрИХ СО РАН способа ускоренного компостирования древесных опилок

15.11.2018 г. Санкт-Петербург

1. Испытания проводились ООО «Орегон СПб» в период с 02.07.2018 г. по 02.10.2018 г. на базе лесопилки (производительность 40 т. опилок в месяц), принадлежащей «Крестьянскому фермерскому хозяйству Филимонов И.В.» и расположенной по адресу: Архангельская область, Устьянский район, с. Березник,

Закладку 30 т свежих древесных опилок (смесь сосна-ель) проводили 02.07.2018 на открытой площадке, свободной от древесной растительности. Температура воздуха + 26 °С. Опилки обрабатывали 100 кг доломитовой муки, вносимой вручную с перемешиванием трактором. К смеси добавляли воду до достижения влажности 60-65 % и оставляли на двое суток для нейтрализации. Затем вручную вносили минеральные добавки: нитроаммофоску (N/P/K 17/17/15) - 7 кг/т и мочевину - 4 кг/т, а также заранее приготовленную композицию микроорганизмов *Acremonium* sp., *Phanerochaete chrysosporium* Burds. 1 MR-1, *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Pilat, , *Phanerochaete chrysosporium* Burds. ATCC-24725, *Sporotrichum pulverulentum*, стерильно высушенную на цеолите (размер гранул 3-5 мм); смесь перемешивали трактором. Формирование бурта проводили трактором с ножом. Температуру измеряли ежедневно в течение первой недели компостирования.

Перемешивание созревающего компоста проводили через 3, 7, 11 недель компостирования путем перемещения слоев бурта при помощи трактора. При первом перемешивании вручную вносили 80 кг доломитовой муки для поддержания оптимальной кислотности субстрата.

Через 3 мес. компостирования (02.10.2018 г.) отбирали пробы на анализ с глубины 0-10, 20-30, 50-60 см в 20 точках по всему периметру бурта и усредняли. Масса средней пробы составила 2 кг.

Испытания проводили:

От ООО «Орегон СПб» А.В. Третьяков

От « Крестьянского фермерского хозяйства Филимонов И.В» И.В. Филимонов

От ИрИХ СО РАН:

с.н.с., к.б.н. Л.А. Беловежец

Генеральный директор ООО «Орегон СПб» И.А. Кренделева

Общество с ограниченной ответственностью ОГРН 1157847245038 "Орегон СПб" Санкт-Петербург

Приложение 2 Протоколы исследований

Российская Академия Наук
Сибирское отделение
ИРКУТСКИЙ ИНСТИТУТ ХИМИИ им. А.Е. ФАВОРСКОГО

4 мая 2009 г.

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ

Наименование: органо-минеральное удобрение на основе опилок
Время отбора: 25.10.2008 г.
Заказчик: ООО «Компания «Северный лес»

Качественный и количественный состав удобрения:

Наименование показателя, ед. измерения	Результат исследований
Внешний вид	Порошок темно-коричневого цвета с примесью древесных опилок
Массовая доля сухого вещества, %	44.6
Зольность, %	20.7
$pH_{водн.}$	6,2
Содержание общего азота (N), % на сухое вещество	1.62
Содержание аммиачного азота ($N\text{-}NH_4$), мг/100 г	500
Содержание нитратного азота ($N\text{-}NO_3$), мг/100 г	140
Содержание фосфора (P_2O_5), % на сухое вещество	0.22
Содержание подвижных форм фосфора (P_2O_5), мг/100 г	1200
Содержание подвижных форм калия (K_2O), мг/100 г	1000
Содержание гуминовых кислот, %	5.3

Содержание токсичных и опасных веществ:

Наименование показателя	Результат исследований, мг/кг
Содержание микроэлементов и тяжелых металлов:	
цинк (Zn)	36
никель (Ni)	<2.0
кобальт (Co)	<1.0
медь (Cu)	4.2
кадмий (Cd)	0,21
свинец (Pb)	0.40
ртуть (Hg)	0.007
Содержание мышьяка (As)	<3.0

Санитарно-бактериологическое и паразитологическое исследование

Наименование показателя	Результат исследований, шт/кг
Индекс ЛКП (лектозоположительные палочки)	Отсутствует
Патогенные микроорганизмы, в т.ч. сальмонеллы	Отсутствует
Индекс энтерококков (фекальные стрептококки)	Отсутствует
Титр клостридий	Отсутствует
Жизнеспособные яйца гельминтов	Отсутствует
Личинки и куколки мух	Отсутствует

Вегетационные исследования

	росток		корень	
	длина, %*	масса, %*	длина, %*	масса, %*
Горох	122	143	100	158
Пшеница	100	121	147	137
Редис		179		212

* - по отношению к контролю при дозе внесения 1 кг/м^2.

Наличие документов о качестве: протокол испытаний Института геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН (аттестат аккредитации аналитического центра № РОСС RU. 0001.513593) от 16.02.2009 г.; протокол испытаний Центра гигиены и эпидемиологии в Иркутской области № 1 от 5.03.2009 г.

Заключение

Органо-минеральное удобрение на основе опилок содержит азот, фосфор, калий в легко усваиваемой растениями форме и в хорошо сбалансированном виде. Эти вещества, а также гуминовые кислоты, входящие в состав удобрения, обеспечивают эффективный рост и развитие растений в течение вегетационного периода. Удобрение не содержит фитопатогенных микроорганизмов и паразитов, а содержание токсичных и опасных веществ в нем значительно меньше предельно допустимых концентраций, установленных для почв. По степени воздействия на организм человека удобрение относится к 4 классу опасности (малоопасное вещество). Удобрение не токсично, пожаро- и взрывобезопасно. По всем физико-химическим и санитарным параметрам удобрение соответствует нормам, предъявляемым к компостам на основе древесных отходов.

Директор ИрИХ СО РАН, академик — Б.А. Трофимов

Зав. лаб. природных синтонов и лигандов, к.х.н. — Б.Г. Сухов

Исполнитель: м.н.с. лаб. природных синтонов и лигандов, к.б.н. — Л.А. Беловежец

Российская Академия Наук
Сибирское отделение
ИРКУТСКИЙ ИНСТИТУТ ХИМИИ им. А.Е. ФАВОРСКОГО

24 мая 2019 г.

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ

Наименование: органо-минеральное удобрение на основе опилок
Время отбора: 02.10.2018 г.
Заказчик: ООО «Орегон СПб»

Качественный и количественный состав удобрения

Наименование показателя, ед. измерения	компост
Внешний вид	Рассыпчатая масса коричневого цвета с вкраплениями структурированных опилок
Массовая доля органического вещества, %	66
Емкость катионного обмена, м*экв/100 гр.	10.75
Гидролитическая кислотность, м*экв/100 гр.	1.12
Сумма поглощенных оснований, , м*экв/100 гр	37.6
pH водный	7.7
pH солевой	7.2
Массовая доля гуминовых кислот в пересчете на сухое вещество, %	9.4
Массовая доля золы, %	12.55
Массовая доля общего азота (N) в пересчете на сухое вещество, %	1.65
Содержание аммиачного азота ($N\text{-}NH_4$), мг/100 г	250
Содержание нитратного азота ($N\text{-}NO_3$), мг/100 г	20
Массовая доля фосфора (P_2O_5) в пересчете на сухое вещество, %	0,44
Содержание подвижных форм фосфора (P_2O_5), мг/100 г	1500
Массовая доля калия (K_2O) в пересчете на сухое вещество, %	0,4
Содержание подвижных форм калия (K_2O), мг/100 г	1000
Соотношение C : N	8.7

Вегетационные исследования

	росток		корень	
	длина, %*	масса, %*	длина, %*	масса, %*
Горох	132	155	105	160
Пшеница	109	138	150	151
Редис		169		198

* - по отношению к контролю при дозе внесения 1 кг/м^2.

Заключение

Органо-минеральное удобрение на основе опилок содержит азот, фосфор, калий в легко усваиваемой растениями форме и в хорошо сбалансированном виде. Эти вещества, а также гуминовые кислоты, входящие в состав удобрения, обеспечивают эффективный рост и развитие растений в течение вегетационного периода. По степени воздействия на организм человека удобрение относится к 4 классу опасности (малоопасное вещество). Удобрение не токсично, пожаро- и взрывобезопасно. По всем физико-химическим и санитарным параметрам удобрение соответствует нормам, предъявляемым к компостам на основе древесных отходов.

Директор ИрИХ СО РАН,
д.х.н А.В. Иванов

Исполнитель: с.н.с. группы
фарм. разработки, к.б.н. Л.А. Беловежец

Приложение 3 Свидетельства о депонировании культур микроорганизмов

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ
им. Г.К. Скрябина Российской академии наук
(ИБФМ РАН)

просп. Науки, д. 5, г. Пущино, Московская обл., 142290
Тел./факс (495) 956-33-70, (495) 632-78-70, тел. (495) 625-74-48, E-mail: boronin@ibpm.pushchino.ru
ОГРН 1025007771491, ИНН/КПП 5039000146/503901001, ОКПО 02699702, ОКВЭД 72.19, ОКОПФ 75103,
Отдел № 34, УФК по Московской области, (ИБФМ РАН лицевой счет № 20486Ц87560),
Р/с 40501810545252000104, ГУ Банка России по ЦФО, БИК 044525

01.11.2017 № 114-02-1-4-1643

на № _____ от _____

СВИДЕТЕЛЬСТВО
о депонировании

Кому Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, 664033, Иркутск-33, а/я 317.
(имя депозитора и наименование организации, адрес)

1. Микроорганизм ***Acinetobacter guillouiae* ACM2**.
(наименование микроорганизма и опознавательная ссылка, присвоенная депозитором [номер, символ и т.д.])

Регистрационный номер, присвоенный ВКМ **ВКМ В-3217D**.

2. Микроорганизм, поименованный в графе 1, сопровождался Ходатайством о депонировании, включавшем:

научное описание	
таксономическое определение	
научное описание и таксономическое определение	+
справку о непатогенности	

3. Настоящим подтверждается, что микроорганизм, поименованный в графе 1, депонирован Всероссийской коллекцией микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН в связи с подачей заявки на оформление национального патента.

Настоящее свидетельство действительно в течение 2 (двух) лет от даты его регистрации

Дата депонирования 12.10.2017.

Заместитель директора Института
докт.биол.наук, профессор Вайнштейн М.Б.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ
им. Г.К. Скрябина Российской академии наук
(ИБФМ РАН)

просп. Науки, д. 5, г. Пущино, Московская обл., 142290
Тел./факс (495) 956-33-70, (495) 632-78-70, тел. (495) 625-74-48, E-mail: boronin@ibpm.pushchino.ru
ОГРН 1025007771491, ИНН/КПП 5039000146/503901001, ОКПО 02699702, ОКВЭД 72.19, ОКОПФ 75103,
Отдел № 34, УФК по Московской области, (ИБФМ РАН лицевой счет № 20486Ц87560),
Р/с 40501810545252000104, ГУ Банка России по ЦФО, БИК 044525

01.11.2017 № 114-02-1-4-1643

на № _____ от _____

СВИДЕТЕЛЬСТВО
о депонировании

Кому Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, 664033, Иркутск-33, а/я 317.
(имя депозитора и наименование организации, адрес)

1. Микроорганизм ***Acinetobacter guillouiae* ACM2**.
(наименование микроорганизма и опознавательная ссылка, присвоенная депозитором [номер, символ и т.д.])

Регистрационный номер, присвоенный ВКМ **ВКМ В-3217D**.

2. Микроорганизм, поименованный в графе 1, сопровождался Ходатайством о депонировании, включавшем:

научное описание	
таксономическое определение	
научное описание и таксономическое определение	+
справку о непатогенности	

3. Настоящим подтверждается, что микроорганизм, поименованный в графе 1, депонирован Всероссийской коллекцией микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН в связи с подачей заявки на оформление национального патента.

Настоящее свидетельство действительно в течение 2 (двух) лет от даты его регистрации

Дата депонирования 12.10.2017.

Заместитель директора Института
докт.биол.наук, профессор Вайнштейн М.Б.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ
им. Г.К. Скрябина Российской академии наук
(ИБФМ РАН)

просп. Науки, д. 5, г. Пущино, Московская обл., 142290
Тел./факс (495) 956-33-70, (495) 632-78-70, тел. (495) 625-74-48, E-mail: boronin@ibpm.pushchino.ru
ОГРН 1025007771491, ИНН/КПП 5039000146/503901001, ОКПО 02699702, ОКВЭД 72.19, ОКОПФ 75103,
Отдел № 34, УФК по Московской области, (ИБФМ РАН лицевой счет № 20486Ц87560),
Р/с 40501810545252000104, ГУ Банка России по ЦФО, БИК 044525

01.11.2017 № 114-02-1-4-1643

на № _____ от _____

СВИДЕТЕЛЬСТВО
о депонировании

Кому Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, 664033, Иркутск-33, а/я 317.
(имя депозитора и наименование организации, адрес)

1. Микроорганизм ***Acinetobacter guillouiae* ACM2**.
(наименование микроорганизма и опознавательная ссылка, присвоенная депозитором [номер, символ и т.д.])

Регистрационный номер, присвоенный ВКМ **ВКМ В-3217D**.

2. Микроорганизм, поименованный в графе 1, сопровождался Ходатайством о депонировании, включавшем:

научное описание	
таксономическое определение	
научное описание и таксономическое определение	+
справку о непатогенности	

3. Настоящим подтверждается, что микроорганизм, поименованный в графе 1, депонирован Всероссийской коллекцией микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН в связи с подачей заявки на оформление национального патента.

Настоящее свидетельство действительно в течение 2 (двух) лет от даты его регистрации

Дата депонирования 12.10.2017.

Заместитель директора Института
докт.биол.наук, профессор Вайнштейн М.Б.