

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
СИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ
Сибирского отделения Российской академии наук

На правах рукописи

ТРЕТЬЯКОВА

Марина Сергеевна

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

03.02.08 – экология

(биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата

биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук,

Ю.А. Маркова

Научный консультант

кандидат биологических наук,

Л.А. Беловежец

Иркутск, 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Общая характеристика нефти и нефтепродуктов.....	8
1.2 Экологический вред, наносимый добычей, транспортировкой и переработкой нефти.....	15
1.3 Механизмы токсического действия нефти.....	19
1.4 Методы очистки нефтезагрязненной территории.....	20
1.5 Пути и механизмы микробной трансформации нефти.....	27
1.6 Разложение нефти при низкой положительной температуре.....	39
1.7 Способность ризосферных и эндосферных микроорганизмов деградировать нефть.....	41
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
2.1 Объекты исследования.....	43
2.2 Методы исследования.....	43
2.2.1 Микробиологические методы.....	43
2.2.2 Молекулярно-генетические методы.....	46
2.2.3 Химические методы.....	48
2.2.4 Агрохимические методы.....	49
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	55
3.1 Характеристика исследуемых микроорганизмов.....	55
3.1.1 Идентификация нефтеокисляющих микроорганизмов.....	61
3.2 Пути деструкции ароматических углеводородов нефти бактериями - нефтеструкторами.....	64
3.3 Выживаемость растений в загрязненных почвах при внесении исследуемых ассоциаций.....	71
3.4 Изменение биологических свойств почвы загрязненной сырой нефтью при внесении ассоциаций микроорганизмов.....	79
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	91
ВЫВОДЫ	94
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	96

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Нефть и нефтепродукты являются одними из самых опасных загрязнителей окружающей среды. Разливы нефти, вызываемые авариями при добыче, переработке нефти, при разгерметизации нефтепроводов наносят ощутимый вред экосистеме. Основную техногенную нагрузку при этом испытывает почва, за счет своей огромной адсорбирующей поверхности она способна аккумулировать загрязнения в больших количествах, что приводит к изменению ее агрохимических, физических, микробиологических характеристик, утрате сельскохозяйственного значения (Kireeva et al., 1996; Габбасова, 2001). Эта проблема актуальна и для Иркутской области, на территории которой сосредоточены 12 крупных нефтяных месторождений, проходят две нитки подземного магистрального нефтепровода, которые проложены на сельскохозяйственных и лесных землях.

Известны более 30 аварийных разливов на территории Иркутской области. Наиболее крупные разливы произошли в Заларинском районе (пос. Тыреть) в 1993 г., площадь загрязненной территории 75 га, в Тулунском районе в 1995 г., площадь загрязненной территории 240 га. В Куйтунском районе в 1998 г. объем вытекшей нефти составил 48 тонн и в Усолье - Сибирском в 2012 г. - площадь загрязненной территории 10 га. (Афони́на и др., 2015). Невозможно исключить вероятность новых аварий, разливов нефти и нефтепродуктов.

В связи с тем, что процесс естественного восстановления нефтезагрязненной почвы очень долгий и может составлять от 10 до 30 лет, необходима разработка технологии очистки почвы от нефти.

В настоящее время наиболее эффективным, экономичным, экологически безопасным методом по очистке нефтезагрязненных территорий является биоремедиация на основе различных микроорганизмов, способных разлагать углеводороды нефти (Хабибуллина и др., 2002; Плешакова и др., 2008; Назина и др., 2013; Мязин, 2014; Fuentes et al., 2014; Xenia et al., 2016;

Тарабукина и др., 2017). При биоремедиации желательное применение аборигенных микроорганизмов, адаптированных к климатическим и экологическим условиям Сибирского региона. Привнесенные чужеродные микроорганизмы не могут конкурировать с аборигенной микрофлорой и вытесняются ей.

В последнее время особое внимание отводится роли эндофитных и ризосферных бактерий в биоремедиации почвы (Ryan et al., 2006; Муратова, 2013; Чеботарь и др., 2015). Есть сведения, указывающие, что растения, выросшие в условиях нефтезагрязнения, селективно накапливают эндофитную микрофлору, имеющую плазмиды для утилизации нефтепродуктов (Siliciano et al., 2001; Oliveira et al., 2017). Также численность микроорганизмов, способных к деструкции загрязнения, в ризосфере растений существенно больше, чем вне ее (Mikolasch et al., 2015).

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

Задачи:

1. Выделить углеводородокисляющие микроорганизмы из эндо- и ризосферы растений, произрастающих на нефтезагрязненной территории, и провести их скрининг по способности разлагать сырую нефть.
2. Определить возможные пути деструкции ароматических компонентов нефти бактериями-нефтедеструкторами.
3. Провести комплексную оценку эффективности нефтеразложения выделенными микроорганизмами: при низких положительных температурах, высокой концентрации нефти и при совместном культивировании.
4. Оценить биологические механизмы протективного действия микроорганизмов-нефтедеструкторов, способствующих лучшему выживанию растений в условиях нефтяного загрязнения.
5. Изучить изменение биологических свойств почвы, загрязненной сырой нефтью, при внесении микроорганизмов-нефтедеструкторов.

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

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

Полученные данные расширяют современное представление об участии эндосферных и ризосферных микроорганизмов в процессе биоремедиации нефтезагрязненных почв. Результаты исследования деградации

ароматических компонентов нефти дают важную информацию для понимания биохимических путей восстановления почв, загрязненной нефтью. Впервые показано, что образование микроорганизмами биосурфактантов способствует снижению токсического действия нефти на растения путем эмульгации нефтяной пленки.

Защищаемые положения:

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

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

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

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на конференциях: VI Всеросс. с междунар. участием конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013», г. Иркутск, 19-23 августа 2013 г., Всеросс. научной конференции с междунар. участием «Экосистемы озера Байкал и Восточной Азии», г. Иркутск, 10-11 октября 2014 г., Всеросс. научно-практической конференции с междунар. участием «Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии», г. Иркутск, 25-27 июня 2015 г., IX Международная научная конференция «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты», г. Минск, 7-11 сентября 2015 г., VIII Всеросс. с междунар. участием конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2015», г. Новосибирск, 5-9 октября 2015 г., 20-

международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», г. Пущино, 18-21 апреля 2016 г., Всеросс. научная конференция с междунар. участием и школа молодых ученых «Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде», г. Иркутск, 12-15 сентября 2016 г., международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», г. Москва, 20-22 февраля 2017 г., международный конгресс «Байкальские чтения», г. Иркутск, 29 августа - 2 сентября 2017 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 работ, в том числе 6 статей в журналах из списка ВАК и 11 тезисов конференций.

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

Место проведения работы и благодарности. Основная часть работы была выполнена в лаборатории растительно - микробных взаимодействий Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН.

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

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика нефти и нефтепродуктов, химический состав

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» (Нефтегазовая энциклопедия, 2003). Нефть относится к группе горных осадочных пород вместе с песками, глинами, известняками, каменной солью и др. Она обладает одним важным свойством - способностью гореть и выделять тепловую энергию, обладая наивысшей теплотворной способностью. В химическом отношении нефть - сложная смесь углеводородов (УВ) и углеродистых соединений (гетероциклов). Нефть включает примерно 250 сернистых, 85 кислородных и 30 азотных гетероциклов. Она состоит из следующих основных элементов: углерод (84-87 %), водород (12-14 %), кислород (до 0.35 %), азот (до 1.8 %), сера (1-8 %). Углеводороды нефти делятся на основные группы: алканы, цикланы, арены, смолы и асфальтены (Сейфуль-Мулюков, 2010; Liang et al., 2012).

АЛКАНЫ (метановые, парафиновые УВ) - углеводороды с общей формулой C_nH_{2n+2} , чей углеродный скелет 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. С увеличением общего количества алканов, как правило, растет отношение *n*-алканов к изо-алканам, в максимальных концентрациях обычно присутствуют *n*-алканы. В силу того, что они обладают малой химической активностью, их еще называют парафиновые (лат. «парум аффинис» – малородственный, т.е. инертный, не склонный к реакциям) углеводороды. В зависимости от молекулярной массы и химической структуры парафиновые

углеводороды находятся в газообразной, жидкой и твердой фазах. Так, первые четыре члена 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 $\text{C}_{15}\text{H}_{32}$ при тех же условиях – жидкости, а от гексадекана $\text{C}_{16}\text{H}_{34}$ и выше – твердые вещества (Нефтегазовая энциклопедия, 2003).

ЦИКЛОАЛКАНЫ (нафтеновые углеводороды) характеризуются формулой C_nH_{2n} . Эти соединения имеют замкнутую углеводородную цепь и, как и парафиновые УВ, являются насыщенными. По плотности, температуре кипения и показателю преломления цикланы занимают промежуточное положение между алканами и аренами с тем же числом углеродных атомов в молекуле. Эти особенности УВ разных классов используются для определения группового и структурно-группового состава фракций нефти и масел битумоидов. По многим химическим свойствам цикланы подобны алканам. Содержание цикланов в нефтях и битумоидах колеблется в пределах 25-75 % (Рябов, 2009).

АРЕНЫ (ароматические УВ) - класс углеводородов общей формулы $\text{C}_n\text{H}_{2n-p}$ ($p = 6, 12, 14, 18, 20, 24, 28, 30, 36$), содержащих циклы с ароматическими связями, в состав молекул которых входит бензольное кольцо (Dooley et al., 1974). Арены наряду с алканами и цикланами составляют основную массу УВ ископаемого органического вещества. В нефтях моноциклические арены представлены бензолом и его гомологами. По физическим и химическим свойствам арены существенно отличаются от алканов и цикланов. Арены имеют значительно более высокую плотность, показатель преломления, температуры кипения и кристаллизации, чем алканы и цикланы с тем же числом углеродных атомов в молекуле. Как правило, содержание аренов в нефтях 15-35 %, что ниже содержания алканов и цикланов. 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 (Рябов, 2009).

СМОЛЫ И АСФАЛЬТЕНЫ. 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 углеводородов и увеличением концентрации ароматических углеводородов. На основании многочисленных исследований химического строения молекул асфальтенов считают, что они представляют собой полициклическую, ароматическую, сильно конденсированную систему с короткими алифатическими заместителями у ароматических ядер. В состав молекулы асфальтена входят фрагменты гетероциклических, алициклических, конденсированных углеводородов, состоящие из 5-8 циклов (Филатов и др., 2012). Смолы не растворяются в бензине и являются полярными веществами с относительной молекулярной массой 500-1200. В них содержатся 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 (Галимова и др., 2015). В сырых нефтях содержание асфальтенов и смол может достигать 15 % (Давыдова, 2004). Также все металлы, находящиеся в нефтях, концентрируются в смолах и асфальтенах (Шуткова, 2012).

Фракции нефти

Сырая нефть, представляющая собой многокомпонентную непрерывную смесь углеводородов и гетероатомных соединений, не используется ни в качестве топлива, ни в качестве сырья для химического производства. Она должна быть переработана для отделения компонентов в менее сложные фракции в соответствии с их температурами кипения. Фракционирование

лежит в основе переработки нефти и получения при этом моторного топлива, смазочных масел и различных других ценных химических продуктов. Переработка нефти делится на первичную (атмосферно-вакуумная перегонка) и вторичную (пиролиз, крекинг) (Методические указания, 2002).

Первичная перегонка нефти является первой стадией изучения ее химического состава. Сущность первичной переработки нефти заключается в том, что она поступает в ректификационные колонны перегонки при атмосферном давлении. Основные фракции, выделяемые при первичной перегонке нефти:

1. Бензиновая фракция – нефтяной погон с температурой кипения от н.к. (начала кипения, индивидуального для каждой нефти) до 150-205 °С (в зависимости от технологической цели получения авто-, авиа- или другого специального бензина). Эта фракция представляет собой смесь алканов, нафтенов и ароматических углеводородов. Во всех этих углеводородах содержится от 5 до 10 атомов углерода.

2. Керосиновая фракция – нефтяной погон с температурой кипения от 150-180 °С до 270-280 °С. В этой фракции содержатся углеводороды C₁₀-C₁₅. Используются в качестве моторного топлива (тракторный керосин, компонент дизельного топлива), для бытовых нужд (осветительный керосин) и др.

3. Газойлевая фракция – температура кипения от 270-280 °С до 320 - 350 °С. В этой фракции содержатся углеводороды C₁₄-C₂₀. Используется в качестве дизельного топлива.

4. Мазут – остаток после отгона вышеперечисленных фракций с температурой кипения более 320-350 °С. Мазут может использоваться как котельное топливо, или подвергаться дальнейшей переработке – крекингу, или перегонке при пониженном давлении (в вакууме) с отбором масляных фракций или широкой фракции вакуумного газойля (в свою очередь, служащего сырьем для каталитического крекинга с целью получения высокооктанового компонента бензина). Это смесь углеводородов (с

молекулярной массой от 400 до 1000), нефтяных смол (с молекулярной массой 500—3000 и более), асфальтенов, карбенов, карбоидов и органических соединений, содержащих различные микроэлементы - (V, Ni, Fe, Mg, Na, Ca, Ti, Hg, Zn и другие).

5. Гудрон - почти твердый остаток после отгона от мазута масляных фракций. Из него получают так называемые остаточные масла и битум, из которого путем окисления получают асфальт, используемый при строительстве дорог и т.п. Из гудрона и других остатков вторичного происхождения может быть получен кокс, применяемый в металлургической промышленности. Выход гудрона - 10-45 % от массы нефти. Гудрон - вязкая жидкость или твердый асфальтоподобный продукт черного цвета с блестящим изломом. В состав гудрона входят парафиновые, нафтеновые, ароматические углеводороды (45-95 %), асфальтены (3-17 %), а также нефтяные смолы (2-38 %). В зависимости от природы нефти и степени извлечения светлых фракций плотность гудрона составляет 0.95-1.03 г/см³, коксуемость 8-26 % по массе, температура плавления 12-55 °С. Гудрон используют для производства дорожных, кровельных и строительных битумов, малозольного кокса, смазочных масел, мазута и моторного топлива.

Качество этих получаемых фракций не соответствует требованиям, предъявляемым к товарным нефтепродуктам, поэтому каждую из полученных фракций подвергают дальнейшей (вторичной) переработке (крекинг, пиролиз, коксование), получая из нее те продукты, которые уже соответствуют промышленным маркам. Это топливо для карбюраторных, дизельных и реактивных двигателей, смазочные масла, смазки, а также парафин, нефтяные растворители, битумы, кокс и другие органические продукты (Плотникова, 2012).

Происхождение нефтяных месторождений

Органическая теория происхождения нефти гласит, что нефть образовалась из останков микроорганизмов, живших миллионы лет назад в обширных водных бассейнах (преимущественно на мелководье). Отмирая,

эти микроорганизмы образовывали на дне слои с высоким содержанием органического вещества. Слои, постепенно погружаясь все глубже и глубже (процесс занимает миллионы лет), испытывали воздействие усиливающегося давления верхних слоев и повышения температуры. В результате биохимических процессов, происходящих без доступа кислорода, органическое вещество преобразовывалось в углеводороды (Тимурзиев, 2013).

Неорганическую теорию происхождения нефти предположил еще Д. И. Менделеев. Он считал, что нефть образуется из глубинных флюидов – жидких и газообразных компонентов магмы или циркулирующих в земных глубинах растворов, насыщенных газами. Предполагается, что во время процессов горообразования вода просачивается вниз по трещинам, пересекающим земную кору. Встречаясь в недрах с карбидами железа, вода вступает с ними в реакцию под действием высоких температур и давления. В результате этой реакции образуются оксиды железа и углеводороды, например этан. По тем же разломам насыщенные углеводородами флюиды поднимаются в верхние слои коры и заполняют твердые породы-коллекторы. Так образуются месторождения нефти и газа (Тимурзиев, 2013).

В настоящее время можно отметить, что происходившие многие годы дискуссии между сторонниками органической и неорганической теориями происхождения нефти закончилась победой первых. Основным весовым аргументом является тот факт, что вся мировая практика успешных нефтегазоносных работ основана на органической теории (Карасева, 2009).

Зависимость состава нефти от месторождения

В России эксплуатируется более 1300 нефтяных месторождений, а в мире более 25 тыс месторождений. Состав нефти каждого месторождения уникален, различны и свойства нефти. В зависимости от месторождения нефть содержит одни и те же компоненты, но может иметь различное их соотношение (табл. 1).

Таблица 1

Диапазон изменений физико-химических параметров нефти в различных нефтегазоносных провинциях России (Требин и др., 1980)

Параметры	20 % залежей	50 % залежей	Республика Коми	Татарстан	Башкортостан	Куйбышевск обл	Волгоград обл	Западная Сибирь	Сахалинская обл
Содержание серы, %	0.5-1.1	0.3-1.7	0.9	1.5	2.8	1.6	0.3	0.9	0.2
Содержание парафинов, %	3.6-4.9	2.7-5.9	2	3.4	4.3	8.9	2.5	2.2	0.4
Газосодерж, м ³ /м ³	39.5-60.5	26-86	9.4	49	15.2	42.3	44.5	89.7	98
Вязкость пластовой нефти мПа/с	1.8-3.5	1.1-6.9	21.2	3.1	20.6	3.5	5.6	0.9	1.5
Вязкость разгазир нефти мПа/с	10.9-18.5	6.4-33	37.1	-	3.3	19.5	20	5.8	2.9
Плотность, г/см ³ пластовой нефти	0.777-0.815	0.741-0.844	0.863	0.807	0.881	0.824	0.823	0.739	0.782
Плотность, г/см ³ разгазир нефти	0.850-0.868	0.835-0.884	0.879	0.866	0.892	0.863	0.869	0.851	0.852
Содержание азота, %	5.0-10.3	3.2-16.4	3.4	8.6	10.6	8.3	2.4	5.6	1.2

Различия в элементном составе нефти проявляется, главным образом, в зависимости от вариации вмещающих пород. Например, суммарное содержание смолисто-асфальтеновых веществ в нефтях снижается с погружением залежи (Иванов и др., 2013).

Самыми крупными месторождениями нефти в Российской Федерации (свыше 1 млрд. т.) являются Самотлорское, Ромашкинское, Приобское, Лянторское газоконденсатное, Фёдоровское, Салымская группа, Уренгойское, Мамонтовское (рис. 1).



Рис. 1. Картограмма показателей добычи и переработки нефти в России (Нефть: добыча и переработка, 2015)

1.2 Экологический вред, наносимый добычей, транспортировкой и переработкой нефти

Почва

При загрязнении нефтью в первую очередь существенно изменяются морфологические признаки почвы. Цвет почвы становится темнее по сравнению с незагрязненными образцами, характерны масляные пленки, отливающие несколькими цветами, которые располагаются по граням структурных отдельностей в иллювиальных горизонтах, а также образуются

столбчатые структуры в нижней части профиля почв (Хазиев, 2012). Вслед за изменением морфологических признаков почвы происходит и изменение физических свойств. Изменяется гранулометрический состав почвы, происходит увеличение количества водопрочных агрегатов, структурных отдельностей размером больше 10 мм, а также агрегирование почвенных частиц, что приводит к росту глыбистых частиц. Происходит вытеснение воздуха, нарушение поступления воды, питательных веществ, почвы теряют способность впитывать и удерживать влагу, а это ведет к неизбежному замедлению темпов развития растений (Шамраев и др., 2009).

В результате загрязнения нефтью изменения затрагивают и химические свойства почв - изменяется содержание органического углерода, состав гумуса, количество и соотношение макро- и микроэлементов (Леднев, 2008; Новоселова, 2008; Сулейманов и др., 2008). Происходит повышение содержания органического углерода, в результате чего нарушается количественное отношение C/N, которое может достигать 400/1, вместо 10/1, благоприятного для нормального развития микроорганизмов и растений, что приводит к ухудшению азотного режима почв и нарушению корневого питания растений (Сулейманов, 2012). При нефтяном загрязнении происходит изменение содержащихся в почве битуминозных веществ и фракционного состава гумуса, уменьшается содержание фульвокислот, гуминовых кислот, что приводит к доминированию последних в составе гумусовых веществ (Сухова и др., 2004). 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 негидролизующей фракции и снижается относительное содержание фракций гидролизующего азота (Назаров, 2010).

Нефть, попадая в почву, вызывает изменения окислительно-восстановительных условий. В результате нарушения аэрации и создания анаэробных условий в толще почвы повышается ее восстановленность и

снижается окислительный потенциал, что приводит к поверхностному заболачиванию почв (Казиахмедова, 2009).

При нефтяном загрязнении существенным образом изменяется почвенная микробиота, причем разные группы микроорганизмов реагируют неодинаково. Загрязнение может, как стимулировать рост определенных видов, так и подавлять развитие других. Все зависит от концентрации и состава нефти. При слабом загрязнении может происходить стимуляция основных групп микроорганизмов, а высокие концентрации угнетать их развитие. С течением времени микробиологическая активность почв, как правило, восстанавливается (Хазиев, 2012). При внесении высоких доз нефти в почву могут накапливаются потенциально опасные для человека виды грибов, например, *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans*, *Fusarium moniliforme* f. *moniliforme*, *Penicillium miczynskii* и *Ulocladium consortiale* (Хабибуллина, Ибатуллина, 2011; Корнейкова и др., 2012; Evdokimova et al., 2013). Наиболее чувствительны к нефтяному загрязнению - актиномицеты, нитрификаторы, целлюлозоразрушающие микроорганизмы. Возрастает видовое разнообразие аммонифицирующих, азотфиксирующих микроорганизмов, микромицетов, дрожжей, сульфатредуцирующих бактерий, углеводородокисляющих микроорганизмов, денитрификаторов. Далее происходит снижение численности гетеротрофных микроорганизмов, при этом доля в них углеводородокисляющих микроорганизмов остается повышенной. Также в результате попадания нефти в почву происходит изменение ее ферментативной активности. Наблюдается снижение активности гидролитических ферментов в почве при загрязнении нефтью: фосфатазы, карбогидраз (инвертазы, амилазы, целлюлазы, ксиланазы), сульфатаз. Ингибирующий эффект возрастает с ростом концентрации нефти. При низких концентрациях (менее 1 %) происходит повышение окислительно - восстановительной ферментативной активности (пероксидазы, полифенолоксидазы, сульфат-, сульфид-оксидаз, аскорбатоксидазы).

Высокие уровни загрязнения также подавляют активность этих ферментов. Изменяется активность каталазы, дегидрогеназы, наблюдается их максимальная активность в первые месяцы после поступления поллютанта при слабом и умеренном загрязнении (Галиулин и др., 2010).

Под действием нефти в почве снижается активности протеаз, аспарагиназы, глутаминазы, нитратредуктазы и нитритредуктазы. Повышается активность гидроксилламинредуктазы, что вероятно, связано с тем, что восстановление нитратов в загрязненных почвах идет по пути ассимиляционной (неспецифической) денитрификации (Новоселова, 2014). Нефтяное загрязнение стимулирует активность уреазы, которая обеспечивает поступление аммиачной формы азота в почву. При низких и средних концентрациях нефти (2-10 %) повышается активность липазы, увеличение дозы поллютанта (более 10 %) ингибирует активность этого фермента на период до 3 лет, после чего липазная активность повышается и сохраняется длительное время на достаточно высоком уровне. Повышение активности фермента происходит в результате накопления в почве продуктов деградации нефти - сложных эфиров карбоновых кислот, которые являются субстратом для липаз (Щемелинина, 2011). Снижение активности ферментов при увеличении дозы загрязнителя в почве объясняется как прямым ингибированием каталитической активности, так и подавлением роста микроорганизмов в результате возникновения анаэробных условий и влияния на них продуктов окисления углеводов, таких как пальмитиновая, бензойная и салициловая кислоты, гексадециловый спирт и др. (Галиулин и др., 2010).

Поверхностные, подземные и грунтовые водоемы

Нефть и нефтепродукты являются распространенными загрязняющими веществами в Мировом океане. Основными источниками загрязнения нефтью являются аварии при транспортировке и добычи нефти, промышленные и бытовые стоки. Общее воздействие нефтепродуктов на водную среду можно разделить на 5 категорий: непосредственное отравление

с летальным исходом, серьезные нарушения физиологической активности, эффект прямого обволакивания живого организма нефтепродуктами, болезненные изменения, вызванные внедрением углеводов в организм, а также изменения в биологических особенностях среды обитания. Каждая из категорий непосредственно влияет на изменение экосистемы Мирового океана (Федоренко, 2016).

Разливы нефти на воде приводят к гибели планктонных организмов, поскольку прекращают доступ кислорода к воде, губят рыбу и мальков рыбы, токсичны для всех обитателей рек, ручьев, озер и морей. Токсическое воздействие углеводов на все формы жизни известно давно и обычно объясняется разжижением липидного слоя цитоплазматической мембраны в присутствии нефти (Некрасова и др., 2017).

Попадающие в природные воды нефтяные загрязнения имеют тенденцию к рассеиванию и миграции. При этом в поверхностных водах состав нефтепродуктов под влиянием испарения и интенсивного протекания химического и биологического разложения претерпевает за короткий срок быстрые изменения, а в подземных водах, наоборот, процессы разрушения заторможены (Войкова и др., 1994). Также нефть и нефтепродукты становятся опасными, если они из сточных вод просачиваются в грунтовые воды и попадают в источники питьевой воды. Токсичные вещества из близко расположенных мест их сбора могут проникать в индивидуальные колодцы, используемые для получения питьевой воды в небольших городах, посёлках и деревнях (Другов и др., 2014).

1.3 Механизмы токсического действия нефти

Токсичность нефти и нефтепродуктов для живых организмов связана с повреждающим действием на мембраны клеток. Взаимодействие липофильных углеводов с клеточными мембранами проявляется на уровне липид-липидных и липид-белковых взаимодействий и приводит к изменению структуры мембраны. В результате изменяется толщина

фосфолипидного бислоя, его текучесть, и активность локализованных в мембране ферментов и транспортных белков. Эти изменения, в свою очередь, приводят к изменениям в функционировании клеточных мембран, в частности, к нарушению их барьерных свойств и увеличению пассивного потока протонов и других внутриклеточных ионов через мембраны. В результате такие изменения в структуре и функциях мембран влияют на энергетический статус клеток и их гомеостаз и, в конечном итоге, могут привести к снижению жизнеспособности. Токсичность углеводов для мембран микроорганизмов имеет сложную зависимость от молекулярного веса n-алкана, хотя в целом доступность легких n-алканов, вероятно, выше за счет более высокой скорости диффузии в липофильных средах по сравнению с более тяжелыми углеводородами. Кроме клеточных мембран, нефть и нефтепродукты могут повреждать генетический аппарат клеток. Очень опасны в этом отношении полициклические ароматические углеводороды (Sikkema et al., 1995). Также токсическое действие углеводов связано с их концентрацией в клеточной мембране, которая зависит от их растворимости в воде. Гидрофобные соединения практически нерастворимы в воде, поэтому они накапливаются в клеточной стенке и оказывают токсическое действие, соответственно, хорошо растворимые в воде компоненты по мере увеличения содержания не оказывают токсическое действие на клетку (Wezel et al., 1995).

1.4 Методы очистки нефтезагрязненной территории, воздуха, воды

Химические методы. Химические методы ремедиации почвы основаны на выжигании нефти, обработке почвы поверхностно-активными веществами, сорбентами или окислителями, либо на экстракции нефти органическими растворителями. Наиболее быстрым способом борьбы с разливами больших количеств нефти и нефтепродуктов является ее выжигание. Однако сжигание нефти и продуктов ее переработки образует опасные вещества, загрязняющие воздух. Кроме того, из-за неполного

сгорания остаточные углеводороды могут постепенно проникать в водоносные горизонты почвы, вызывая возникновение долговременных экологических проблем (Миертус и др., 2001; Поташников, 2004).

Физические методы. К физическим методам ликвидации загрязнения 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 (Подалов и др., 2010).

Механические методы. 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. Механический метод применяют для предотвращения распространения нефти по поверхности, а также для сбора товарной нефти путем откачки или с применением сорбентов. Эффективность достигается в первые часы после аварии, когда толщина слоя нефти высока (Незнамова, 2007; Лазарев, 2014). Механическое удаление загрязняющих веществ (например, углеводородов) из окружающей среды зависит от дорогостоящих, медленных и неэффективных методологий (Mandri et al., 2007; Al-Majed, 2012).

Физико-химические методы. К физико-химическим методам восстановления земель относятся: обработка их 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 – обработку 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 (Аренс и др., 1999). Извлеченные с помощью физико-химических приемов загрязнения в виде растворов могут быть в дальнейшем переработаны, сконцентрированы и обезврежены, а очищенная почва возвращена на место (Кузнецов и др., 2012).

Термические методы. Термодесорбция и термодеструкция: процессы термического воздействия на нефтезагрязненный материал (обычно на грунты и буровые шламы). Такой способ предполагает предварительное обезвоживание отходов. В ходе нагрева в барабанной печи происходит выпаривание углеводородов. Содержание углеводородов в материале значительно снижается. Можно говорить о 0.5 % остаточного содержания углеводородов в материале после термического обезвреживания. Сам конечный материал можно использовать в качестве строительного песка или рекультиванта. Недостаток в том, что метод требует сбора и вывоза грунта, его предварительного обезвоживания. Оставшаяся минеральная часть после термодеструкции может использоваться в качестве сырьевых компонентов при строительстве, но происходит потеря ценных углеводородов (Erdogan et al., 2011).

Биологические методы - биоремедиация. Биоремедиация - использование природных микроорганизмов для эффективного разложения загрязняющих веществ в окружающей среде (Chandra et al., 2013; Fukuhara et al., 2013; Shankar et al., 2014). Этот метод является ценной альтернативой физическим и химическим методам очистки (Thapa et al., 2012). Основными преимуществами метода является эффективность, экономичность (табл. 2), 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 (Coulon et al., 2010; Malik et al., 2012; Руденко, 2012; Phulia et al., 2013; Alwan et al., 2013).

Таблица 2

Сметные расходы восстановления нефтезагрязненной территории

(Fuentes et al., 2014)

Стратегия восстановления	Обрабатываемый участок	Стоимость \$ US/м ³
Биологические методы - биостимуляция	In situ	30-100
биоаугментация	In situ	30-100
биоудаление	In situ	79-970
компостирование	Ex situ	630-757
Запахивание отходов в почву	Ex situ	30-70
Физико-химические методы - Паровая экстракция	In situ	405-1.485
Термальная десорбция	Ex situ	44-252

Технологии биоремедиации разделяются на различные типы биоремедиация *ex situ* и биоремедиация *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 и необходимость в транспортировке загрязнённой почвы отсутствует (Хуе et al., 2010; Tomei et al., 2013; Angelucci et al., 2016). Биоремедиация *in situ* складывается из комбинации двух основных подходов: биостимуляции и биодополнения (биоаугментации) (Рогозина и др., 2010).

Биостимуляция. Этот метод основан на стимулировании метаболической активности углеводородокисляющей микрофлоры (Roy et al., 2014). 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 %. Регуляция кислотности - значения рН близкие к нейтральным являются оптимальными для роста углеводородокисляющих микроорганизмов.

Для ускорения деструкции нефтяных загрязнений применяют минеральные удобрения (Попов, 2010, Пунтус и др., 2015), например, нитроаммофоску, содержащую азот, фосфор, калий, а также органические удобрения, сурфактанты (поверхностно-активные вещества) (Марченко, 2011; Phglia et al., 2013), навоз, отработанный грибной компост, кукурузу (Hamdi et al., 2007; Kauppi et al., 2011; Suja et al., 2014).

Биоаугментация. Это добавление в природную среду адаптированных к загрязнителю активных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов или биопрепаратов на их основе, с одновременным внесением биогенных элементов (Khan et al., 2013; Pimmata et al., 2013; Simarro et al., 2013). Когда следует использовать биоаугментацию:

1. Концентрация загрязнителя в почве или относительно высока (аборигенная микрофлора не справляется с количеством загрязнителя), или низка (аборигенная микрофлора не справляется с качеством загрязнителя).

2. Загрязнитель – устойчивое соединение, которое плохо поддается разложению естественной микрофлорой даже в том случае, если для неё созданы оптимальные условия роста. Плотность популяции и метаболическая

активность природных углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) в нефтешламах в большинстве случаев крайне низкие, поэтому здесь очевидно использование биоаугментации.

3. Загрязнитель попал в почву в результате недавнего разлива органических соединений. Естественной микрофлоре необходимо время для адаптации к ксенобиоту (Walls, 2010; Ndimele, 2010; Dave et al., 2011).

Фиторемедиация. Фиторемедиация - это восстановление почвы, основанное на использовании растений в связи с их способностью извлекать токсичные вещества из окружающей среды или превращать их в безопасные соединения - метаболиты (Das et al., 2011; Barrutia et al., 2011; Liu et al., 2011; Alwan et al., 2013; Al-Baldawi et al., 2015).

Выделяют следующие основные методы очистки загрязнений с помощью растений: *Фитоэкстракция* - использование растений для экстрагирования загрязняющего вещества и аккумуляирования их в тканях, после чего надземная растительная биомасса собирается. Растительный материал может далее либо использоваться для непищевых целей (производство дерева, картона), либо сжигаться с последующим вывозом золы на свалку или, в случае ценных металлов, рециркуляцией накопленных элементов. Данная технология главным образом используется для очистки от неорганических поллютантов (металлы, селен, мышьяк, радионуклиды). Для фитоэкстракции часто применяют горчицу (*Brassica juncea*) и подсолнечник (*Helianthus annuus*), из-за их быстрого роста, большой биомассы и высокой устойчивости к неорганическим поллютантам. *Фитофльтрация* - адсорбция или осаждение растворенных в воде солей металлов на поверхности водных или надземных растений в условиях гидропоники за счет ее ионообменных свойств и образования нерастворимых соединений. При этом используемые наземные растения подразделяют на способные к ризофильтрации, т.е. удаление металлов поверхностью корней растений и блястофильтрации - очистке с помощью проростков, выращенных на загрязненной воде. *Фитоволятизация* – испарение усвоенного растением из почвы или воды

загрязнителя с выделением его в изменённом или неизменном виде в атмосферу, после чего он рассеивается до безопасных концентраций. Данный процесс эффективен в отношении Se и Hg. *Фитостабилизация* – использование толерантных к загрязнению растений для снижения распространения загрязнителя в окружающей среде, уменьшения его биодоступности. *Ризоремедиация* - деструкция органических загрязнителей ассоциированными с растениями микроорганизмами. Способность растений к ризодеградации, еще называют ризосферно-усиленной биodeградацией или растительно-усиленной биodeградацией. Принцип этой технологии состоит в том, что разложение загрязняющих углеводов производится не непосредственно самим растением, а микроорганизмами, обитающими в непосредственной близости к его корням, т.е. в ризосфере. Роль растения заключается в значительном усилении эффективности работы микроорганизмов за счет биологически активных корневых выделений, хотя результаты отдельных исследований показали, что растения, помимо стимуляции микробов, могут и сами принимать непосредственное участие в разложении УВ. *Фитodeградация* - деградация растительными ферментами органических загрязнителей, например, углеводов нефти. Фитodeградация - «внутреннее» разрушение углеводов растением после поглощения, разложение их в ходе метаболических процессов, либо «внешнее», когда нефтепродукты разлагаются под действием корневых выделений (Копчик и др., 2014).

Растения, используемые для биологической мелиорации загрязненных нефтью и нефтепродуктами почв, должны обладать следующими свойствами: длительным периодом жизни, способностью расти на низкоплодородных почвах, что особенно важно для северных регионов. Они должны выделять в почву большое количество корневых экссудатов (аминокислоты, простые сахара, полисахариды, флавоноиды и др.), стимулирующих развитие ризосферной микробиоты, и синтезировать экзоферменты, трансформирующие загрязняющие вещества в менее

токсичные соединения. По результатам исследований, проведённых в различных регионах, для фиторемедиации рекомендованы следующие виды дикорастущих и сорта культурных растений: овсяница красная и луговая, тимофеевка луговая, мятлик луговой, костер безостый, райграсс пастбищный, крестовник скученный, лисохвост луговой, бархатцы прямостоячие, рожь озимая, овес, овсюг, донник, рапс, сурепица, люцерна, свербига, козлятник, кукуруза, подсолнечник, вика, клевер, суданская трава (Хабибуллина и др., 2011), зеленые бобы, соя, рожь многолетняя, волоснец песчаный, двукисточник тростниковидный, бодяк щетинистый (Маслова и др., 2010; Денисова и др., 2011; Заушинцева и др., 2013), кострец безостый, бархатцы прямостоячие, дягиль лекарственный (Киреева и др., 2011).

1.5 Пути и механизмы микробной трансформации нефти

Основные виды бактерий-нефтедеструкторов, разработка микробиологических препаратов и их применение

В настоящее время известно более ста родов бактерий, дрожжей и мицелиальных грибов, представители которых являются ключевым звеном в биодеградации углеводов. Их спектр включает в себя бактерии различных родов. Это *Acetobacter*, *Acinetobacter* (Throne-Holst et al., 2007; Tanase et al., 2013), *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Achromobacter* (Denga et al., 2014), *Halomonas* (Mnif et al., 2009; Mnif et al., 2011), *Pseudomonas* (Borzenkov et al., 2006; Al-Mailem et al., 2014; Ramadass et al., 2016), *Aeromonas*, *Enterobacter* (Jain et al., 2010), *Serratia* (Rajasekar et al., 2011). *Sarcina* (Adetitun et al., 2012), *Micrococcus* (Ilori et al., 2000), *Bacillus* (Kumar et al., 2007), *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* (Zvyagintseva et al., 2001), метаногены - *Methanobacterium*, микобактерии – *Mycobacterium*, стрептомицеты – *Streptomyces* (Kuznetsov et al., 1992, Ferradji et al., 2014), сероокисляющие бактерии – *Thiobacillus*, кислородные фототрофные бактерии *Nostoc* (Marinescu et al., 2016), мицелиальные грибы – *Aspergillus*, *Acremonium*, *Penicillium*, *Mucor* (Singh, 2006), *Fusarium*, *Trichoderma*, дрожжи

– *Candida* (Рябцева др., 2015), *Debaryomyces*, *Endomyces*, *Endomycopsis*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, цианобактерии - *Agmenellum*, *Aphanocapsa*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Plectonema* (Nkwelang et al., 2008; Гершенкоп и др., 2010; Joutey et al., 2013, Kaczorek et al., 2013; Wojcieszynska et al., 2013; Григорьева и др., 2013; Wojcieszynska et al., 2014; Rodgers-Vieira et al., 2015; Smulek et al., 2015; Lade et al., 2015).

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 ассоциации микроорганизмов для осуществления ремедиации (Zaki et al., 2013).

Препараты были созданы на основе следующих микроорганизмов: Псевдомин, Путидойл, Эконадин (*Pseudomonas*), Аллепро, Олеоворин, Биодеструктор, Дестройл (*Acinetobacter*), Родотрин, Родер, Руден, Гера (*Rhodococcus*), Бациспектин (*Bacillus*), Торнадо (*Arthrobacter*). На основе консорциума микроорганизмов имеются: Деворойл, Накойл-1 (*Pseudomonas*, *Rhodococcus*), Ленойл (*Bacillus*, *Arthrobacter*), Нафтокс (*Mycobacterium*, *Pseudomonas*), Биосет (*Micrococcus*, *Arthrobacter*), СОВЕ-10 (*Bacillus*, *Rhodococcus*, *Providencia* и *Citrobacter*). Однако информация о препаратах крайне ограничена и проходит, в основном, на уровне реклам (Рогозина и др., 2010; Водянова и др., 2010, Кузнецов и др., 2012).

Данные препараты выпускаются в трех основных формах: жидкая несепарированная биомасса после ферментации с массовой долей влаги до 99 % и титром 10^7 - 10^8 КОЕ/см³); пастообразная (сепарированная биомасса с

массовой долей влаги до 30 % и титром до 10^9 – 10^{10} КОЕ/см³); сухая (лиофилизированная или распылительно-высушенная в токе теплого воздуха) биомасса с влажностью 3-5 % и титром 10^9 – 10^{11} КОЕ/г). Единой и стандартизированной 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, куда будут помещены) благоприятные условия для жизнедеятельности и развития (источники питания, необходимый тепловой и водный режимы и т.д.). Т.е., микроорганизму необходимо создать благоприятную экологическую нишу, в которой он будет развиваться. 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. Это вызвано возможностью использования различных углеводов как источника энергии у данных микроорганизмов и определяется их физиолого-биохимическими особенностями, способностью разрушать тяжелые или легкие фракции углеводородного сырья (Винокуров и др., 2013).

При поиске микроорганизмов-деструкторов для разработки микробиологических препаратов 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 рН среды, нехватка питательных элементов (Кабиров, 2009; Киреева и др., 2009; Рогозина и др., 2010; Галиулин и др., 2010; Водянова и др., 2010; Баракнина, 2011; Артюх и др., 2014).

Таким образом, создание универсального бактериального препарата невозможно. Во-первых, нефти разных месторождений отличаются друг от друга фракционным и композиционным составом. Во-вторых, в практике биоремедиации приходится сталкиваться не только с нефтяными загрязнениями, но и с загрязнениями нефтепродуктами, которые резко отличаются по химическим свойствам от исходной нефти. В-третьих, районы добычи, переработки, и хранения нефти и нефтепродуктов значительно отличаются друг от друга по природно-климатическим и гидротермическим условиям.

Пути деструкции нефти

Для наиболее рационального использования микроорганизмов необходимо иметь представление о возможных путях разложения отдельных фракций нефти.

Углеводороды нефти окисляются микроорганизмами в следующей последовательности: алифатические > ароматические > смолы > асфальтены (почти не окисляются). Наиболее активно разрушаются углеводороды с прямой цепью, n-алканы с длиной цепи C₁₂-C₂₂. 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. Биodeградация 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 (Macaulay, 2015).

Гены, кодирующие ферменты деструкции

Гены бактерий, ответственные за деградацию углеводов, находятся в хромосомах (гены центрального метаболизма), но они не могут содержать все гены, необходимые для окисления большого количества соединений нефти. В этом случае метаболизм большинства соединений осуществляется при участии ферментов, кодируемых плазмидами (гены периферийного метаболизма) (Grund, 1992, Трошкова и др., 2011). Так плазида pWWW кодирует ферменты окисления толуола, плазида деградации NAH кодирует ферменты окисления нафталина. Ключевой фермент пути расщепления камфоры – камфора 5 монооксигеназа локализована на SAM плазмиде. Плазида OСТ отвечает за разложение алканов, октана и гексана, XYL – ксилола и толуола (Ветрова и др., 2008).

Деструкция алканов C_nH_{2n+2} . Наиболее изучены пути деградации микроорганизмами алканов, так как это одни из самых доступных для деградации соединений, которые могут служить единственным источником углерода и энергии для сапрофитных микобактерий и родственных им организмов, для ряда видов псевдомонад, нескольких видов дрожжей и некоторых мицелиальных грибов.

Известны три пути окисления алифатических углеводов:

1. монотерминальное окисление *n*-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 (Тимергазина, 2012).

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 (Ившина, 1987). 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 *n*-гексадекана у представителей рода *Rhodococcus* происходит с участием трехкомпонентного алкан-гидроксилазного комплекса, состоящего из растворимых NADH-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 (Жуков и др., 2006). Дальнейшее разложение жирных кислот протекает путем β -окисления, заключающегося в последовательном отщеплении двухуглеродных фрагментов в виде ацетата, который затем поступает в цикл трикарбоновых кислот. Наряду с β -окислением может идти дитерминальное окисление с образованием ω -оксимонокарбоновых, а затем и дикарбоновых кислот (Ившина, 1987). Окисление монокарбоновой кислоты в оксимонокарбоновую идет с включением молекулярного кислорода. При последующем превращении оксигруппы ω -оксимонокарбоновой кислоты в карбоксильную группу дикарбоновой кислоты кислород воздуха в ряде обменных реакций может заменяться кислородом воды.

Конечные продукты метаболизма нефти в почве следующие:

- углекислота (связывается в составе карбонатов) и вода;
- кислородсодержащие соединения (спирты, кислоты, альдегиды, кетоны), которые частично входят в почвенный гумус, частично растворяются в воде и удаляются из почвенного профиля.

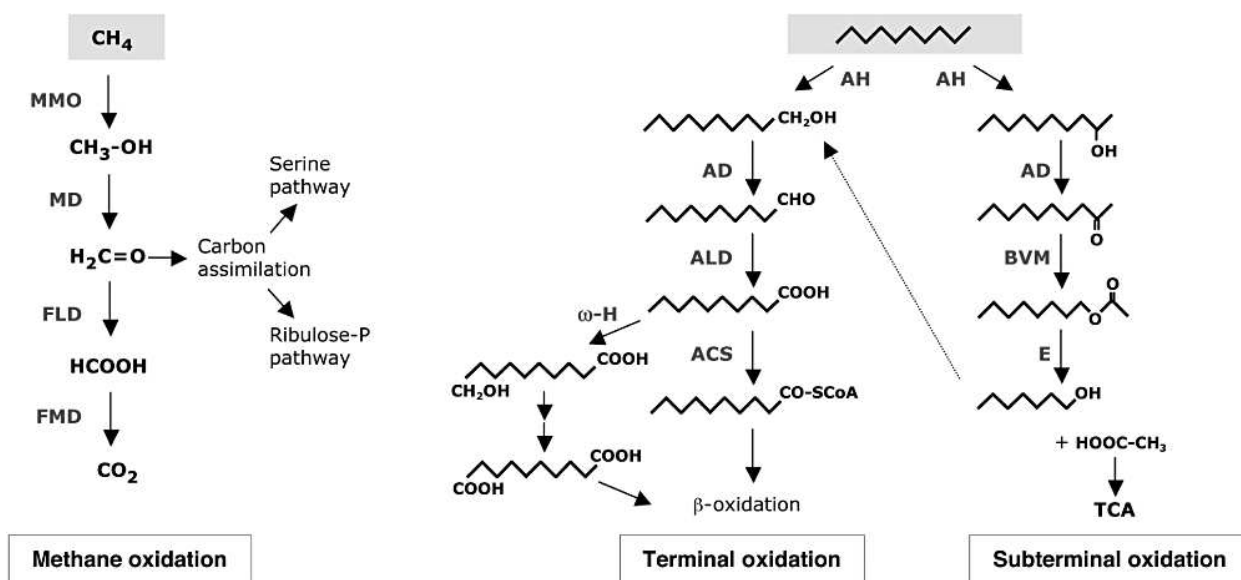


Рис 2. Окисление алифатических углеводородов (Rojo, 2009).

Деструкция циклоалканов C_nH_{2n} . Циклоалканы поддаются биологическому разложению труднее алканов, что связано с наличием цикла, который окисляется сложнее, чем молекулы с линейной структурой. Штаммы, способные деградировать циклоалканы, имеют специфические ферментные системы, окисляющие циклогексан до циклогексанола, а его – до адипиновой, валериановой, муравьиной кислот. Белок, катализирующий первую реакцию, гомологичен бутан-монооксигеназе (Ветрова, 2013). Отсутствие открытой концевой метильной группы как у *n*-алканов усложняет первичную атаку. Циклоалканы, включая конденсированные циклоалканы, деградируются по механизму со-окисления (рис. 3.).

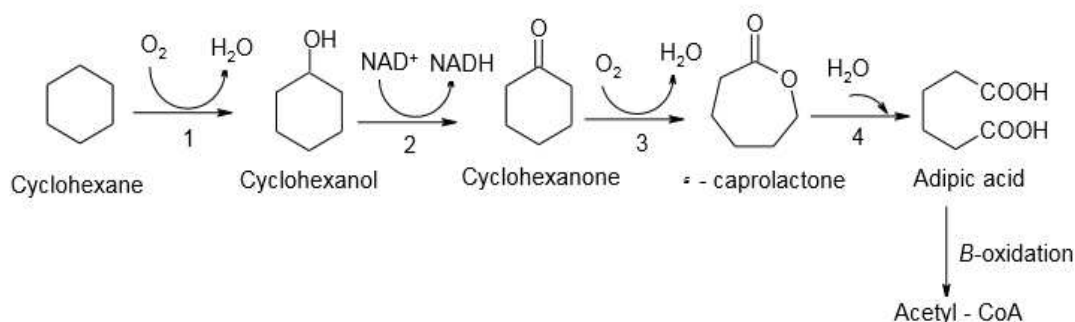


Рис 3. Деградация циклогексана: 1-циклогексанмонооксигеназа, 2 –циклогексанол дегидрогеназа, 3-циклогексанон монооксигеназа, 4-капролактонгидролаза (Olajire and Essien, 2014).

Деструкция ароматических углеводов C_nH_{2n-6} . Структура

ароматических углеводов является крайне устойчивой, трудно поддается разрушению, поэтому их разрыв в неизменном виде невозможен. Аэробные микроорганизмы окисляют ароматическое кольцо до таких дигидроксиароматических соединений как протокатеховая кислота, гентезиновая кислота, пирокатехин, после чего следуют реакции, связанные с раскрытием ароматического кольца. При этом раскрытие ароматического кольца для пирокатехина и протокатеховой кислоты, катализируемое диоксигеназами может идти между двумя гидроксильными группами – интрадиольный путь (орто-расщепление) (рис. 4) или рядом с одной из гидроксильных групп – экстрадиольный путь (мета-расщепление) (рис. 5). (Baboshin, 2012).

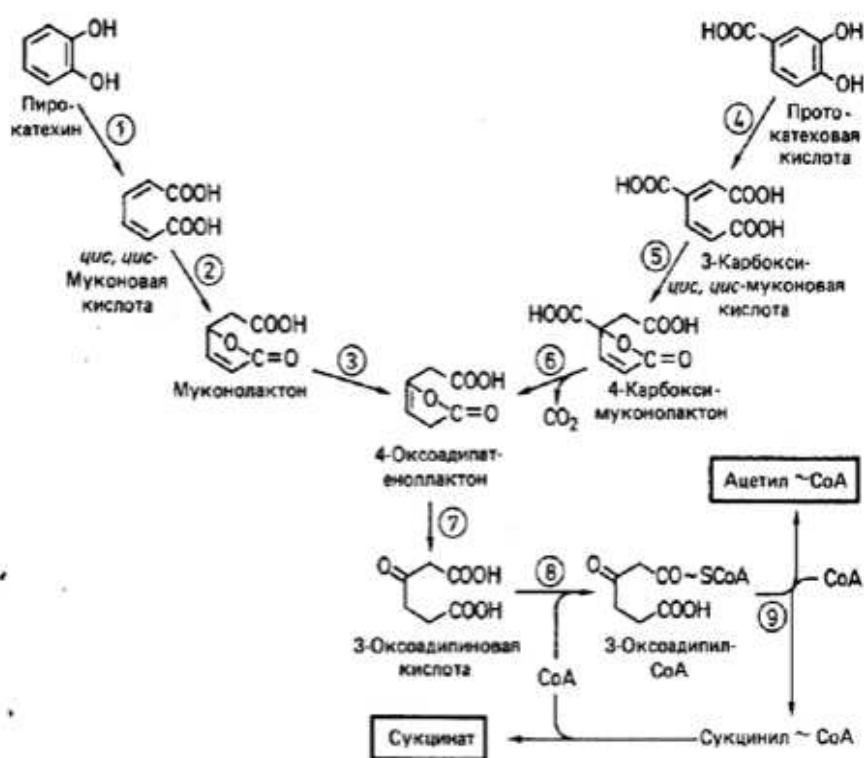


Рис 4. Орто - расщепление ароматического кольца: 1- пирокатехаза, 2- муконатциклоизомераза, 3- муконолактон-изомераза, 4 - протокатехат 3,4 диоксигеназа, 5 - 3- карбоксимуконат циклоизомераза, 7 - 4- оксоадипат-еноллактон гидролаза, 8- 3 - оксоадипат-сукцинил CoA трансфераза, 9- 3- оксодипил CoA –тиолаза

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 поступают в цикл Кребса. В раскрытии пирокатехина по мета-пути могут быть задействованы два механизма.

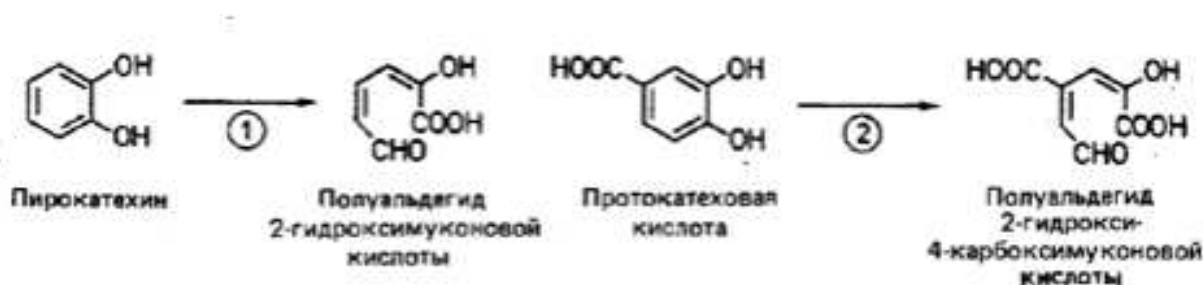


Рис 5. Мета - расщепление ароматического кольца: 1- метапирокатехаза (катехол 2,3 диоксигеназа), 2- протокатехат 4,5 диоксигеназа

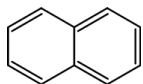
Согласно первому, альдегид 2-гидроксимукононой кислоты под действием НАД-зависимой дегидрогеназы может окисляться до соответствующей 2-гидроксимукононой кислоты, которая под действием таутомеразы переходит в таутомерную форму. На следующих этапах происходит декарбоксилирование. В соответствии со вторым механизмом, гидролитическое расщепление альдегида 2-гидроксимукононой 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 по механизму β -окисления расщепляются до более коротких боковых фрагментов, после чего образовавшиеся интермедиаты претерпевают расщепление ароматического кольца по одному из приведенных выше механизмов (Хоменков и др., 2008).

Дегградация толуола. Имеется множество путей дегградации ароматических соединений, например, толуол дегградируется бактериями пятью различными путями. Первым шагом дегградации толуола *Pseudomonas putida* является введение двух гидроксильных групп в толуол, образуя цис-толуол-дигидродиол. Этот интермедиат затем преобразуется до 3-метилкатехола. У *Pseudomonas mendocina* толуол преобразуется толуол 4-монооксигеназой до *p*-крезола. У *Pseudomonas pickettii*, толуол окисляется 3-монооксигеназой до *m*-крезола, который в дальнейшем окисляется до 3-метилкатехола другой монооксигеназой. У *Bukholderia cepacia*, толуол метаболизируется до *o*-крезола толуолоксигеназой, этот интермедиант трансформируется другой монооксигеназой до 3-метилкатехола (Тимергазина и др., 2012).

Деструкция полиароматических углеводов. Полиароматические углеводороды (ПАУ) – наиболее трудноразлагаемые органические поллютанты, обладающие токсичными, канцерогенными и мутагенными свойствами. К самым устойчивым соединениям можно отнести бенз(а)пирен.

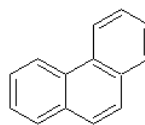
Бактерии и некоторые зеленые водоросли окисляют ПАУ, используя оба атома молекулярного кислорода (реакция катализируется диоксигеназой), при этом получается цис-гидродиол, который затем подвергается гидрогенизации, образуя пирокатехин. Скорость дегградации ПАУ обратно пропорциональна числу колец в молекуле. Это связано с низкой водной растворимостью, которая снижается с увеличением числа ароматических колец. Ферментативная атака колец ПАУ происходит только в аэробных условиях. 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 (Коршунова и др., 2010).

Самый простой с химической точки зрения ПАУ – **нафталин** $C_{10}H_8$,



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-дигидрокси-нафталина 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 идет с участием салицилат-5-гидроксилазы через гентизиновую кислоту или пирокатехин. При этом, в случае пирокатехина, конечными продуктами биоразложения являются ацетил- и сукцинил кофермент-А, а в случае гентезиновой кислоты – ацетоацетат и фумарат (Хоменков и др., 2008).

Окисление фенантрена $C_{14}H_{10}$.



Известны несколько микроорганизмов, утилизирующих фенатрен как единственный источник энергии: *Commomonas testosterone*, *Burkholderia* sp, *Alcaligenes faecalis*, *Springomonas* sp, *Micobacterium* sp., *Pseudomonas putida* (Тимергазина, 2012). Описаны два различных пути деградации фенантрена. Сначала фенатрен 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 *o*-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 (Кошелева и др., 2000, Пунтус и др., 2008).

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 (рис.6) (Ленёва и др., 2009).

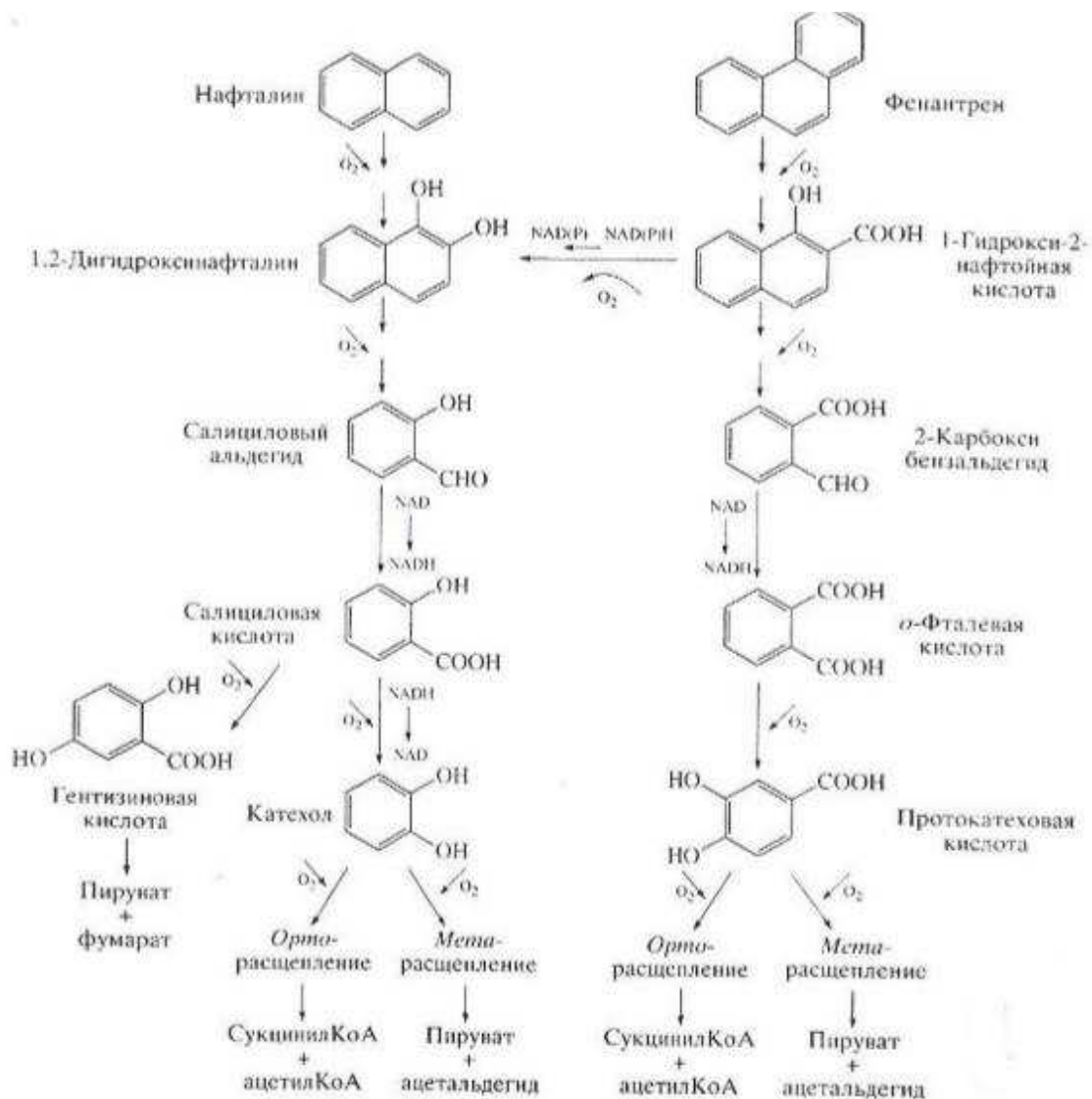


Рис 6. Пути микробной деградации нафталина и фенантрена (Пунтус и др., 2008)

Деструкция асфальтенов и смол. Известно, что биodeградация тяжелых фракций нефти, содержащих смолы и асфальтены, затруднена их устойчивостью (Тимергазина и др., 2012; Сулейманов и др., 2012) к воздействию ферментов и малой способностью диспергироваться в жидкой

среде. Они содержат большое число полиароматических соединений с конденсированными ядрами, среди которых относительно биodeградируемы только соединения с тремя и четырьмя ароматическими кольцами (Филатов и др., 2012; Копытов и др., 2013). Однако имеются сообщения об их высокой скорости окисления при оптимальных условиях (Tang и др., 2012; Chang и др., 2013). В работе (Сазыкин и др., 2011) были выделены микроорганизмы, активно деградирующие асфальтены (*Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Micrococcus luteus*, *Acinetobacter calcoaceticus*) и смолы (*Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter calcoaceticus*). При биодеструкции смол и асфальтенов образуются 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 (Филатов и др., 2012).

1.6 Разложение нефти при пониженной температуре

Одним из важных факторов, влияющих на способность микроорганизмов к разложению нефти, является температура. Так, для развития углеводородокисляющих микроорганизмов и интенсификации процесса деструкции углеводородов оптимальными являются мезофильные условия, т. е. 20-28 °С. Однако большинство месторождений нефти расположено в северных регионах. Поэтому в районах с холодным климатом, где период деструкции может составлять 50 лет (Алексеев, 2011) и более, встает вопрос о целенаправленном внесении селекционированных штаммов-деструкторов. Короткое лето - основной лимитирующий фактор при

биоремедиации загрязненных объектов окружающей среды в зоне холодного и умеренного климата. При низкой температуре деструкция нефти аборигенной микробиотой почти не происходит, а также отсутствуют физико-химические факторы разложения (солнечное излучение, ферменты микроорганизмов, растений и окислительные химические соединения). Понижение температуры нарушает биодоступность и растворимость гидрофобных углеводородных субстратов и увеличивает вязкость углеводородов, при этом уменьшается скорость диффузии органических компонентов. В настоящее время имеются работы, посвященные поиску микроорганизмов деструкторов углеводородов, устойчивых к низким температурам. Пырченковой И.А. с соавторами (Пырченкова и др., 2006) изучена способность микроорганизмов - нефтеструкторов и деструкторов ПАУ к росту на дизельном топливе и нефти при 4-6 °С и 24 °С, а также при повышенной концентрации NaCl (до 6 %). Показано, что у р. *Rhodococcus* sp. (штаммы Q15, S26, X5) и у р. *Pseudomonas* sp. (штамм 142 NF) степень деструкции выше при 4-6 °С, чем при 24 °С.

Коршунова Т.Ю. с соавт. (Коршунова и др., 2012) из техногенно-загрязненной почвы Красноярского края выделила и идентифицировала 8 бактериальных штаммов, способных к разложению углеводородов: декана, толуола и β-метилнафталина в условиях низких положительных температур. Показано, что *Pseudomonas* sp. (штамм 1.1), *Pseudomonas* sp. (штамм 1.2), *Rhodococcus* sp. (штамм 3.3) и *Acinetobacter* sp. (штамм 4.3) проявляют повышенную деструктивную активность при 4-6 °С. В дальнейшей работе Коршуновой Т.Ю. с соавторами обнаружена высокая способность к разложению парафиновых углеводородов и ароматических углеводородов при температуре 8 °С *Pseudomonas* sp. (штамм ИБ 1.1.) (Коршунова и др., 2016).

В работе (Margesin и др., 2014) показано, что *Rhodococcus erythropolis* (штамм BZ4), был способен к деградации углеводородов при 15 °С, *Rhodococcus cercidiphyllus* (штамм BZ22), *Arthrobacter sulfureus* (штамм

BZ73) и *Pimelobacter simplex* (штамм BZ91) деградировали *n*-алканы (C₁₂-C₂₂), ароматические углеводороды (фенол) и полиароматические углеводороды (антрацен, пирен) при 1-30 °С.

1.7 Способность ризосферных и эндофитных микроорганизмов деградировать нефть

Некоторые исследования (Siliciano, 2001; Gomes et al., 2010; Yousaf et al., 2011) показали, что микробная популяция в ризосфере и эндосфере растений обогащена важными катаболическими генами - плазмидами для деградации углеводородов, что способствует процессу детоксикации углеводородов в загрязненных районах. Растения, выращенные в почве, загрязненной ксенобиотиками, естественным образом набирали эндофитные микроорганизмы с генами, разрушающими загрязнение. Было проверено, что на участках, загрязненных нефтяными соединениями, гены, кодирующие деградацию нефтяных соединений (алканмонооксигеназа и нафталиндиоксигеназа), были более распространены в эндофитных и ризосферных штаммах (Zareen Khan and Sharon Doty, 2011). Первое исследование, демонстрирующее способность эндофита деградировать нитроароматические загрязняющие вещества, было сделано Ван Эйкеном и сотрудниками (Aken et al., 2004). Авторы описали эндофит *Methylobacterium populum* sp. (штамм BJ001), выделенный из тополя, который был способен разрушать взрывчатые вещества, такие как TNT (2,4,6-тринитротолуол) и RDX (гексагидро-1,3,5-тринитро-1,3,5-триазин). Штамм минерализовал приблизительно 60 % RDX до двуокиси углерода за 2 месяца.

Наиболее распространенными родами, выделенными из эндосферы растений, являются р. *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus* и *Azospirillum* (Lodewyckx et al., 2002).

Например, известны эндофитные микроорганизмы, деградирующие нафталин - *Pseudomonas* sp., *Moraxellaceae* sp, *Micrococcus* sp., *Sphingobium*

sp., *Microbacterium* sp., *Acinetobacter* sp., *Ochrobactrum* sp., деградирующие дизельное топливо - *Pseudomonas rhodesiae*, *Pantoea* (Oliveira et al., 2013).

Также известна способность эндофитных бактерий действовать в качестве стимуляторов роста растений или повышать устойчивость растений к патогенам (Comrant et al., 2005; Zachow et al., 2008, Иванова и др., 2015).

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования. Объектами исследования стали микроорганизмы, выделенные из почвы, эндо - и ризосферы растений, отобранных на нефтезагрязненной территории Иркутского региона (п. Тыреть). В 1993 г. на этой территории произошла крупная нефтяная авария. В результате прорыва нефтепровода вытекло примерно 14 тонн нефти. Использовали следующие виды растений на стадии цветения: Лопух (*Arctium lappa*), Лапчатка (*Potentilla anserina*), Пырей (*Elytrigia repens*), Осока (*Carex acuta*). Образцы лугово-болотной почвы и растения отбирались в июле 2009 г.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Микробиологические методы

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

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. Затем полученные суспензии высевали в накопительную среду следующего состава (г/л): KNO_3 - 4.0, KH_2PO_4 - 0.6, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - 1.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.8, вода водопроводная 1 л, pH-7.0, в которую в качестве единственных источников углерода добавляли гексан, автомобильное масло, отработанное автомобильное масло и бензин в концентрации 2 % (V/V). Микроорганизмы инкубировали 30 сут при постоянном встряхивании на качалке (130 об/мин), при температуре 26 °С. Для получения чистых культур углеводородокисляющих микроорганизмов использовали агаризованную среду МПА.

Для выявления наиболее активных деструкторов нефти использовали 2-х суточные культуры бактерий, в концентрации 10^7 КОЕ/мл, добавляли в жидкую минеральную среду 8Е следующего состава (г/л): NH_4NO_3 - 1.0; MgCl_2 - 0.1; KH_2PO_4 - 3.0; K_2HPO_4 - 7.0; CaCO_3 - 1.0; pH 7.0, куда в качестве единственного источника углерода и энергии вносили сырую нефть (АНХК г. Ангарск (процентное содержание С - 85 %, Н - 11.76 %, S - 0.92 %) в концентрации 2 % от общего объема минеральной среды. Культуры выращивали при температуре 26 °С, в темноте. Первичную биodeградацию нефти в колбах оценивали по эмульгации поверхностной пленки нефти, помутнению минеральной среды, газообразованию. После 2-х мес культивирования определяли убыль нефти гравиметрическим методом (Другов и др., 2014). Для этого нефть экстрагировали гексаном (высшей степени очистки). В пробы культуральной жидкости (50 мл) и контроля добавляли гексан (25 мл). Тщательно встряхивали смесь в делительной воронке в течение 15 мин. После разделения фаз сливали нижний слой (минеральная среда) в колбу. Оставшийся верхний слой (экстракт) выпаривали под вытяжкой. Экстрагирование 1 пробы проводилось 3 раза. Контролем служила стерильная питательная среда, содержащая 2 % нефти.

Определение способности бактерий утилизировать нефть при различных ее концентрациях в среде. Исследование проводили в жидкой минеральной среде 8Е, содержащую 5, 10, 15, 20 и 50 % нефти. Инокуляцию проводили из расчета 5 мл посевного материала на 100 мл среды. Культивирование проводили в колбах при 26 °С. Через 2 мес культивирования определяли убыль нефти гравиметрическим методом (Другов и др., 2014).

Изучение способности штаммов к деструкции тетрадекана, дизельного топлива на твердой минеральной среде. Для исследования использовали минеральную среду 8Е с добавлением агара, куда вносили нефтепродукты в разных концентрациях 1.0; 2.5; 5.0; 7.5; 10.0 % (об) (тетрадекан, дизельное топливо), разливали в чашки Петри до застывания. Культуры высевали на

чашки, и оставляли на 10 суток. Результаты опытов оценивали по системе - «++» – наличие активного роста, «+» - наличие роста и «-» – отсутствие роста.

Изучение морфологических, биохимических свойств выделенных культур. Изучение тинкториальных свойств проводили с помощью окраски по Граму, а также тесту КОН (Нетрусов и др., 2005). Определение оксидазы проводили по изменению окраски раствора тетраметил-п-фенилендиамина. Выявление каталазы определяли при выделении пузырьков газа (Экологическая микробиология, 2016). Декарбоксилирование аминокислот аргининдигидролазы, лизиндигидролазы и ортининдигидролазы изучали с помощью наборов для микробиологических исследований (НИЦФ, Санкт-Петербург).

Для определения окисления и ферментации глюкозы штаммами использовали окислительно-ферментативный тест. Для этого использовали среду следующего состава (г/л): пептон - 2.0; D-глюкоза – 10.0; агар - 2.5; бромтимоловый синий (индикатор) - 0.03; NaCl - 5.0; K₂HPO₄ - 0.3; окончательный pH=7.1 (среда зеленого цвета). Для каждой исследуемой культуры всегда используют 2 пробирки с ОФ-средой. Образование кислоты в обеих пробирках свидетельствует об анаэробном пути расщепления углевода, наличие кислотообразования только в открытой пробирке указывает на аэробное расщепление. Цвет среды не меняется, если бактерии не обладают окисляющей активностью. Определение амилалитической и протеолитической активности проводили стандартными методами по методике (Нетрусов, 2005).

Изучение разложения нефти ассоциациями микроорганизмов. Были проверены следующие ассоциации бактерий:

Rhodococcus erythropolis (108) + *Acinetobacter guillouiae1* (112), *Acinetobacter guillouiae1* (112) + *Acinetobacter guillouiae2* (114), *Rhodococcus erythropolis* (108) + *Acinetobacter guillouiae2* (114), *Rhodococcus erythropolis* (108) + *Acinetobacter guillouiae1* (112) + *Acinetobacter guillouiae2* (114),

Pseudomonas sp.1 (90) + *Pseudomonas oryzihabitans* (102) + *Pseudomonas* sp.2 (109) + *Rhodococcus erythropolis* (108) + *Acinetobacter guillouiae1* (112) + *Acinetobacter guillouiae2* (114). Для этого использовали жидкую минеральную среду 8E с добавлением нефти в концентрации 10 % (V/V). В экспериментальные колбы со стерильной средой вносили по 1 мл суспензии клеток микроорганизмов-деструкторов. Титр исследуемых культур составлял 10^7 КОЕ/мл. Культивирование проводили при температуре 26 °С в течение 2 мес. После 2 мес определяли убыль нефти гравиметрическим методом.

Изучение способности микроорганизмов разлагать нефть при низких положительных температурах. Ассоциации микроорганизмов: *Rhodococcus erythropolis* (108) + *Acinetobacter guillouiae1* (112), *Rhodococcus erythropolis* (108) + *Acinetobacter guillouiae2* (114), *Rhodococcus erythropolis* (108) + *Acinetobacter guillouiae1* (112) + *Acinetobacter guillouiae2* (114), *Acinetobacter guillouiae1* (112) + *Acinetobacter guillouiae2* (114) культивировали в жидкой минеральной среде 8E, куда вносили нефть в концентрации 10 % (V/V). Культивирование проводили в течение 2 мес при температуре 4 °С и 10 °С.

2.2.2 Молекулярно-генетические методы

Для уточнения видовой принадлежности чистых культур проводили анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК (Матвеева, 2011, Григорьева, 2013).

Этапы работы:

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

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

ПЦР-амплификация нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Для амплификации гена 16S рРНК использовали универсальные эубактериальные праймеры 8f (5'-agagtttgatcctggctcag-3') и 1492r (5'-

gggtaccttggtacgactt-3') производства «Праймтех» (Беларусь) и реагенты фирмы «Thermo Scientific».

Реакционная смесь содержала: 10 нг ДНК матрицы, 1×буфер для DreamTaq-полимеразы, 2,0 mM MgCl₂, по 2,0 mM каждого дНТФ, по 10 пМ каждого праймера, 2,5 ед. DreamTaq-полимеразы.

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

Электрофоретический анализ продуктов ПЦР-амплификации. Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1 % 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).

Очистка продукта ПЦР. Для очистки целевого продукта ПЦР использовали коммерческий набор DNA Extraction kit (Thermo Scientific, Germany), согласно прилагаемой инструкции.

Секвенирование гена 16S рРНК, сравнение, анализ нуклеотидных последовательностей. Реакцию секвенирования проводили, используя набор реагентов DNA Cycle Sequencing Kit (Jena Bioscience, Germany), 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 с использованием базы данных GenBank и программы Nucleotide

BLAST (Матвеева, 2011, Григорьева, 2013). Секвенирование проводили в институте Микробиологии НАН Беларуси (г. Минск).

2.2.3 Химические методы

Определение состава низкомолекулярных фенольных соединений. Состав фенольных соединений (ФС) определяли в этилацетатных экстрактах, полученных из культуральных жидкостей. Бактерии (10^7 КОЕ/мл) выращивали в минеральной среде 8Е нефть (10 % по объему) (Хабибуллина и др., 2000). В течение 8 недель, еженедельно отбирая по 50 мл культуральной жидкости. Пробу подкисляли 2Н НСl до рН 3.0, а ФС экстрагировали этилацетатом в соотношении 1:1 (об/об). Затем растворитель удаляли в токе холодного воздуха, а остаток перерастворяли в 0.2 мл метанола. Состав ФС определяли методом ВЭЖХ. Контролем служила минеральная среда без добавления бактерий.

Продукты деструкции нефти определяли на жидкостном микроколоночном хроматографе «Милихром А-02» («Научприбор», Россия) на 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 - 0.2 н. перхлорат Li в 0.1 %-ном водном растворе трифторуксусной кислоты и Б - 100 %-ный ацетонитрил (сорт «0»). Для установления природы мажорных компонентов разделение проводили в градиенте ацетонитрила (Б) от 5 до 100% , изменяя его концентрацию от 5 до 28% в течение 1-9 мин и от 46 до 100 % 9-18 мин. Объем пробы - 4 μл, детектирование осуществляли при 250, 280, 290, 300 и 310 нм. Идентификацию ФС проводили по времени удерживания стандартных метчиков, с последующим определением УФ-спектров компонентов. Для предварительной идентификации ФС использовали библиотеку спектров «БД-2003-500» для «Милихром А-02».

В качестве стандартных метчиков наносили протокатеховую, ванилиновую, и коричную кислоты («Serva», США); бензойную («Реахим», Украина); *n*-кумаровую, *n*-оксибензойную, *o*-протокатеховую, салициловую,

сиреневую, феруловую, кофейную, пирокатеховую и гидрокоричную кислоты («Реахим», Россия), гентизиновую кислоту («Sigma-Aldrich», США), а также *o*-ванилин («Merck», Германия), *o*-крезол («Acros», Германия), коричный спирт («WOSMRI», Китай) и коричный альдегид («ZJP&Chemical CO, Ltd», Китай).

2.2.4 Агрохимические методы

Изучение влияния штаммов на прорастание семян и рост растений редьки масличной в условиях нефтезагрязнения. Для изучения комплексного взаимодействия растения, эндо - и ризосферных микроорганизмов были использованы семена редьки масличной *Raphanus sativus var. oleiferus* (L.) Sazonova & Stank. селекционный образец СИФИБР СО РАН «Линия ИрГСХА», так как она обладает стабильно хорошей всхожестью при различных условиях выращивания, высокой скоростью прорастания и коротким периодом посев - всходы. В то же время проростки редьки масличной весьма чувствительны к нефтяному загрязнению. Все это, а также широкое использование редьки в сельскохозяйственном производстве, как кормовой и сидератной культуры, обусловило ее выбор для модельного эксперимента. Для выращивания растений использовались пластиковые контейнеры со стерильным песком. Семена редьки масличной предварительно стерилизовали, сначала 96 % этанолом в течение 1 мин, а затем 3 % пероксидом водорода в течение 20 мин, после чего их тщательно промывали и замачивали на 24 ч в суспензии бактерий (10^7 КОЕ/мл). В качестве контроля служили растения, семена которых были замочены в стерильной водопроводной воде. Затем семена высевали в контейнеры с увлажненным песком (60 % ПВ) с добавлением нефти до концентрации 2 % (V/V). Растения выращивали в контролируемых условиях: t - 20 °С, освещение - 2.1 клк, фотопериод 14/10 ч (день/ночь). На 14-е сутки эксперимента оценивали эффект токсического действия нефти на растение и его уменьшение в присутствии микроорганизмов. Для этого анализировали всхожесть, массу и длину надземной части растения и корней.

Для стимуляции образования ауксинов культурами в жидкую минеральную среду (состав (г/л): NH₄NO₃ - 1.0, MgCl₂ - 0.1, KH₂PO₄ - 3.0, K₂HPO₄ - 7.0, CaCO₃ - 1.0, pH 7.0), добавляли D, L - триптофан в концентрации 200 мг/л. Количество ауксинов определяли по методу Сальковского в модификации Гордона и Вебера (Чумаков и др., 1992), а их биологическую активность – с помощью двух биотестов: по подавлению прорастания семян горчицы сарепской и по интенсивности укоренения черенков фасоли (Возняковская, 1969; Методы определения фитогормонов и фенолов, 1979).

Изучение гибберелиноподобной активности штаммов. Изучение гибберелиноподобной активности (ГПА) проводили по эндоспермальному тесту на беззародышевых половинках семян ячменя (Методы определения фитогормонов и фенолов, 1979). Контролем служила стерильная питательная среда без бактерий. ГПА вычисляли по калибровочному графику, полученному для ряда концентраций (0.001-0.1%) натриевых солей гибберелиновых кислот.

Для определения полной влагоемкости почвы используют цилиндр с сетчатым дном. Погружают цилиндр с почвой в сосуд с водой и доводят уровень воды в сосуде до уровня почвы в цилиндре. После того, как вода пропитала всю почву, дают стечь излишней воде, протирают увлажненную поверхность цилиндра, взвешивают и производят расчеты по формуле:

$$A = 100 (c - v) / (v - a), \quad (1)$$

где: А – влагоемкость почвы, %; а – масса пустого цилиндра, г; в – масса цилиндра с почвой до погружения в воду, г; с – масса цилиндра с почвой после насыщения водой, г. (Воробьева, 1998).

Образование биосурфактантов микроорганизмами определяли косвенными методами: по снижению поверхностного натяжения, показателю гидрофобности, появлению эмульгирующей активности культур. Использовали жидкую минеральную среду (Willumsen et al., 1997) с добавлением сырой нефти в концентрации 2 % (V/V) и микроорганизмов в

концентрации 10^7 кл./мл. Контролем служила жидкая минеральная среда с нефтью без внесения микроорганизмов.

Эмульгирующую активность определяли визуально. Для этого в химической пробирке смешивали 4 мл бактериальной суспензии с 3 мл дизельного топлива и встряхивали на орбитальной качалке при 200 об/мин с последующим отстаиванием в вертикальном положении в течение 1 ч для разделения водной и углеводородной фаз. Наличие или отсутствие эмульсии на границе раздела фаз определяли визуально. При наличии эмульсии через 24 ч отстаивания рассчитывали индекс эмульгирования (E_{24}) по формуле:

$$E_{24} = (V_{\text{э}}/V) \times 100\%, \quad (2)$$

где V – общий объем среды, равный 10 мл, $V_{\text{э}}$ - объем плотной эмульсии (мл), образуемой при перемешивании изученной среды с дизельным топливом (Cooper et al., 1987).

Способность бактерий к снижению поверхностного натяжения нефти определяли в чашках Петри диаметром 15 см, куда помещали 20 мл дистиллированной воды, затем вносили 1 мкл сырой нефти. На поверхность нефти добавляли 100 мкл супернатанта культуры микроорганизма и через 30 сек измеряли диаметр образовавшейся чистой зоны (Ягофарова и др., 2012).

Показатель гидрофобности бактериальных клеток определяли следующим образом: 4 мл бактериальной суспензии встряхивали с 1 мл хлороформа в пробирке, отстаивали в течение 1 ч. Далее измеряли оптическую плотность бактериальной суспензии при длине волны 540 нм, гидрофобность клеток рассчитывали по формуле:

$$ПГ = 100 - [(ОП_1 \cdot 100) / ОП_0], \quad (3)$$

где ПГ – показатель гидрофобности в %, $ОП_0$ -исходная оптическая плотность бактериальной суспензии, $ОП_1$ - оптическая плотность после встряхивания с хлороформом (Серебрякова и др., 2002).

Наблюдения за характером развития корневой системы и концентрацией на ней микроорганизмов проводили с использованием светового микроскопа “PERAVAL Interphako” (CarlZeissJena, Германия). Для лучшей визуализации

бактерий на корнях использовали витальный краситель бриллиантовый крезоловый голубой (“Merck”, Германия) или альциановый голубой.

Изучение влияния микроорганизмов-нефтедеструкторов на биологические свойства почвы, загрязненной нефтью. Исследование проводили на серой лесной почве (гумус 7.52 %; N_{общ} 0.35 %, C: N =15, РН_{H2O} 5.7), отобранной на территории СИФИБР СО РАН. В контейнеры помещали по 200 г почвы, затем искусственно загрязняли ее сырой нефтью в конечной концентрации 10 % (V/V). Почву инокулировали суспензией микроорганизмов-деструкторов с титром 10⁷ КОЕ/мл и тщательно перемешивали стерильным шпателем. Перед внесением консорциума культуры микроорганизмов перемешивали. Контролем служила загрязненная почва без внесения микроорганизмов. Инкубирование почвы проводили в течение 60 сут при температуре 25 °С.

Изменение биологических свойств почвы оценивали по изменению ферментативной и дыхательной активности почвы, фитотоксичности и общей численности почвенной микрофлоры. На рис. 7 представлена схема эксперимента.

Варианты эксперимента

1. Загрязненная нефтью почва (без бактерий)
2. Загрязненная почва + *Rhodococcus erythropolis* (108)
3. Загрязненная почва + *Acinetobacter guillouiae1* (112)
4. Загрязненная почва + *Acinetobacter guillouiae2* (114)
5. Загрязненная почва + *Rhodococcus erythropolis* (108) + *Acinetobacter guillouiae1* (112) + *Acinetobacter guillouiae2* (114).

Отбор образцов на определение дыхательной активности, рыхление и увлажнение проводили 1 раз в неделю. Определение фитотоксичности почвенного раствора 1 раз в две недели. В начале и конце эксперимента производился количественный учет клеток микроорганизмов, анализ ферментативной активности и определение остаточного содержания нефти путем экстракции.

Рис 7. Модельный эксперимент с нефтезагрязненной почвой

Определение влажности почвы проводили термостатно-весовым методом, высушивая навеску почвы при 105 °С до постоянного веса. Влажность почвы (%) определяли по формуле:

$$W = ((m - m1) 100) / m1, \quad (4)$$

где m – масса почвы до высушивания; $m1$ – вес абсолютно сухой, т.е. высушенной при 105 °С почвы (Химический анализ почв, 1998).

Определение эмиссии CO₂ почвой проводили адсорбционным методом, согласно подходу, описанному в работе Пуртовой (Пуртова и др., 2011). Методика основана на измерении количества CO₂, выделившегося из почвы за определенный промежуток времени, и состоит в следующем: в контейнер с почвой погружали чашечку с 5 мл поглощающей щелочи и оставляли на 24 ч. В качестве поглотителя CO₂ использовали 0.1 н раствор КОН. Контейнер тщательно закрывали, промазывая крышку герметиком, и оставляли на 24 ч. Затем проводили титрование щелочи 0.1 н раствором H₂SO₄ 1 % спиртовым раствором фенолфталеина. Интенсивность выделения CO₂ почвой определяли по формуле:

$$D = \frac{(a-b) 8.8}{ST} \quad (5)$$

D – количество CO₂, выделившегося из почвы, мг/дм²/ч

a – количество 0.1 н H₂SO₄, которое пошло на титрование щелочи при определении содержания CO₂ в воздухе сосуда-изолятора, мл;

b – количество 0.1 н H₂SO₄, затраченное на титрование щелочи в опыте, мл;

S – площадь изолируемой поверхности, дм²;

T – время экспозиции;

8.8 – количество CO₂, поглощаемое 1 мл 0.1 Н раствора щелочи, мг.

Интенсивность эмиссии CO₂ из почвы определяли как количество CO₂ (мг), выделившегося с поверхности почвы (дм²) за 24 ч.

Для учета численности микроорганизмов в почве навеску пробы массой 1 г переносили в колбу, содержащую 100 мл стерильной водопроводной

воды, и взбалтывали на качалке 10 мин, затем проводили серию 10-кратных разведений. Из полученных разведений делали высев на агаризованные среды. Для учета численности гетеротрофных бактерий делали высев на МПА, актиномицетов - на среду Чапека, грибы - на среду Сабуро. Инкубировали при 26 °С в термостате. После этого производили подсчет выросших колоний (Нетрусов, 2005).

Определение ферментативной активности почв. Ферментативную активность почвы определяли по методам, применяемым для исследования почвенных ферментов: активность каталазы перманганатометрически, полифенолоксидазы и пероксидазы йодометрически (Хазиев, 1990).

Определение фитотоксичности почвенного раствора проводили методом проростков. Образцы незагрязненной и загрязненной почвы (по 30 г) помещали в чашки Петри диаметром 10 см, и производили посев семян растений на увлажненную фильтровальную бумагу: по 50 - в случае редиса (*Raphanus sativus*, сорт Дуро краснодарское), 30 - пшеницы (*Triticum*, сорт Гром) и 20 - гороха (*Pisum sativum*, сорт Сахарный стручок). Учет количества взошедших семян проводили на 3-й день. Всхожесть семян рассчитывали как отношение числа проросших семян к общему числу семян (Писарчук, 2014).

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

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Характеристика исследуемых микроорганизмов

Известно, что при разработке способов микробной деструкции различных нефтяных загрязнений, целесообразным является выделение и скрининг микроорганизмов, адаптированных к определенным климатическим и почвенным условиям, ведь привнесенные микроорганизмы не могут конкурировать с автохтонной микрофлорой и могут быстро элиминироваться из экосистемы. Поэтому для каждого региона необходимо создание собственных микробных препаратов, в состав которых входят только аборигенные микроорганизмы.

В последнее время особое внимание отводится 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. Кроме того, в ризосфере растений, выращенных в загрязненной почве, численность нефтеокисляющих микроорганизмов, выше, чем в почве без растений (Mukasheva et al., 2013).

Работа проводилась 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 (лапчатка, лопух, осока, пырей), а также образцы почвы (табл. 3).

Из эндо- и ризосферы исследуемых растений и почвы было выделено 60 культур микроорганизмов, потенциально обладающих углеводородокисляющими свойствами. Полученные микроорганизмы были исследованы на способность разлагать сырую нефть в жидкой минеральной среде. Количественная оценка деструктивной активности у штаммов показала различную степень утилизации. Микроорганизмы условно разделили на слаборазрушающие, где остаточное содержание нефти составляло 20 % нефти; среднеразрушающие, остаточное содержание нефти

составляло до 35 %; и сильноразрушающие нефть, для которых убыль нефти составляла 40-54 % (табл. 4).

Таблица 3

Характеристика культур бактерий

Номер культуры	Объект выделения
75,76, 77, 78, 81, 82, 83, 84	Эндосфера пырея (<i>Elytrigia repens</i>)
85,86,87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96	Эндосфера осоки (<i>Carex acuta</i>)
64,65,66	Эндосфера лапчатки (<i>Potentilla anserina</i>)
59, 60	Эндосфера лапчатки (<i>Potentilla anserina</i>)
67,68,69, 70,71,72,73,74	Эндосфера лопуха (<i>Arctium lappa</i>)
94, 97, 102, 104	Ризосфера осоки (<i>Carex hancockiana maxim</i>)
98, 99, 100, 105	Ризосфера осоки (<i>Carex hancockiana maxim</i>)
108, 114, 116	Ризосфера пырея (<i>Elytrigia repens</i>)
109, 112, 106, 111	Ризосфера пырея (<i>Elytrigia repens</i>)
120, 121, 122, 124, 130,132, 133, 137, 138, 131	Почва
129, 139	Почва

Таблица 4

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

Степень деструкции	Убыль нефти, массовые, %	Штаммы
Слаборазрушающие	5-10	59, 111
	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

Для дальнейших исследований были взяты 6 наиболее активных в отношении углеводородов нефти штаммов микроорганизмов. При

визуальном исследовании выяснилось, что культуры 102, 108, 109, 90, разлагали нефть с образованием эмульсии (рис. 8).

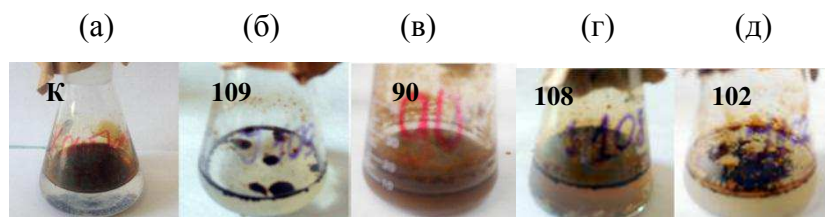


Рис. 8. Дегградация углеводородов нефти в жидкой минеральной среде после 60 сут культивирования: (а) - контроль; (б) - добавление в среду штаммов 109; (в) - 90; (г) - 108; (д) - 102.

Убыль нефти при культивировании штаммов 112 и 114 составила 50 и 54 %. При этом не происходило эмульгирование нефти, но наблюдалось истончение нефтяной пленки, ее обесцвечивание. Культуральная жидкость становилась мутной за счет увеличения биомассы бактерий, отмечалось выраженное газообразование (рис. 9).

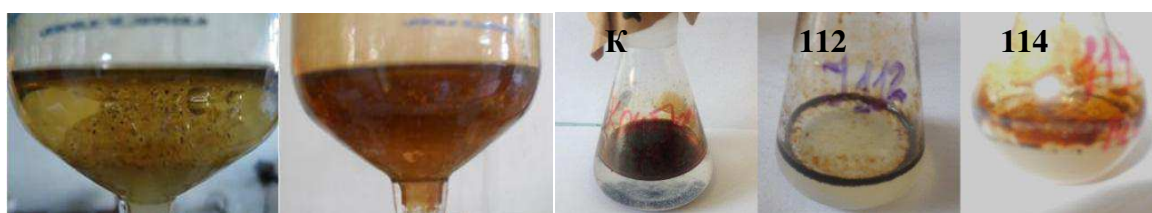


Рис. 9. Образование газов штаммом 112 и 114 при разложении сырой нефти после 60 сут культивирования

При экстракции отмечено, что часть вещества не растворялась ни в водной фазе, ни в гексане, образуя соломенно-желтую, желеобразную субстанцию. Возможно, в данном случае происходило преимущественное разложение ароматической составляющей нефти.

Таким образом, культуры бактерий утилизировали нефть с разной эффективностью. Наибольшую деградирующую способность показали 6 штаммов 90, 102, 108, 109, 112, 114.

Определение способности выбранных культур к деструкции нефтепродуктов на твердой минеральной среде показал активный рост всех исследованных штаммов как на тетрадекане, так и на дизельном топливе при различных концентрациях в среде. Особенно активный рост показали три штамма 108, 112, 114 (табл. 5).

Рост бактерий на среде с тетрадеканом, дизельном топливом через 14 сут
культивирования при температуре 26 °С

Штамм	Тетрадекан, %					Дизельное топливо, %				
	1	2.5	5	7.5	10	1	2.5	5	7.5	10
112	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
114	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
108	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+
109	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
102	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
90	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

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

Дальнейшая оценка отобранных штаммов была проведена по их способности к росту на жидкой минеральной среде, содержащей различные концентрации сырой нефти. Ведь главной проблемой биоремедиации является то, что микроорганизмы не способны существовать при высоких концентрациях нефти, поэтому этот метод может не подходить для свежих проливов нефти. Было показано, что при увеличении концентрации в среде нефти скорость ее деградации снижалась. Тем не менее, убыль нефти при концентрации 20 % составила от 7 до 18 % (V/V), при содержании нефти в питательной среде 50 %, убыль нефти составила от 4 до 10 % (табл. 6).

Таким образом, отобранные штаммы были проверены на способность выживать при высокой концентрации нефти. Показано, что 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.

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

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

Известно, что применение ассоциаций микроорганизмов при биоремедиации почв гораздо эффективнее применения индивидуальных штаммов (Ветрова и др., 2013). 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, одной из задач данной работы явилось изучение деградации нефти ассоциациями микроорганизмов. Для этого были проверены различные по видовому составу композиции, было составлено 5 различных бактериальных консорциумов. Показано, что убыль нефти была на уровне 25-30 %, т.е. все композиции эффективно разлагали нефть (табл. 7). Таким образом, эффективность разложения нефти ассоциациями микроорганизмов достоверно была выше, чем при использовании монокультур.

Одним из важных факторов, влияющих на способность микроорганизмов к разложению нефти, является температура. Так, для развития углеводородокисляющих микроорганизмов и интенсификации процесса деструкции углеводородов оптимальными являются мезофильные условия, то есть 20-28 °С. Так как Иркутская область относится к регионам, где теплый период непродолжителен, поиск микроорганизмов деструкторов

углеводородов, устойчивых к низким температурам, актуален. Поэтому на следующем этапе работы была проведена оценка деструктивного потенциала штаммов в отношении углеводородов нефти при низких положительных температурах. Установлено, что при температуре близкой к нулю разложение нефти практически не происходило (убыль нефти не превышала 3.5 %) (табл. 7).

Таблица 7

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

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

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

В тоже время, при незначительном повышении температуры скорость деструкции увеличивалась. Особенно выделилась ассоциация 112 и 114 культур, где убыль нефти за 2 мес культивирования составила 15 %. При совместном действии этих микроорганизмов отмечено разрушение нефтяной пленки с образованием мелких капель нефти.

Таким образом, полученные результаты показали, что при понижении температуры до 10 °С эффективность деградации нефти микроорганизмами снижается, но, тем не менее, убыль нефти достигала 15 %. При комбинации ассоциации 112+114 культур убыль нефти была максимальной.

3.1.1 Идентификация нефтеокисляющих микроорганизмов

С целью идентификации выделенных штаммов проведены исследования по изучению их тинкториальных и физиолого-биохимических признаков. Результаты проведенных анализов представлены в таблице 8 .

Штамм 90 образовывал колонии среднего размера (около 1.5-2.5 мм), светло-желтого оттенка, гладкие, блестящие, круглой формы, с ровными краями, слабовыпуклые, однородной структуры, мягкой консистенции, слизистые. При микроскопии мазков наблюдали прямые палочки. Клетки грамотрицательные. Аэробы. Каталазо- и оксидазоположительные.

Штамм 102 образовывал гладкие, желтые, блестящие, круглой формы, с ровными краями, выпуклые, однородной структуры, мягкой консистенции, слизистые колонии. При микроскопии мазков наблюдались прямые палочки, одиночные и в парах. Клетки грамотрицательные. Аэробы. Выделяли пигмент. Каталазо - и оксидазоположительные.

Штамм 108 образовывал средние колонии размером около 1.5-2.5 мм, кремового цвета, матовые, пастообразные, выпуклые, с ризоидным краем, шероховатой структуры. Клетки грамположительные. Образовывали на ранней стадии развития рудиментарный мицелий, который в дальнейшем распадался на фрагменты, в результате превращающиеся в палочки, а затем кокки. Аэробы. Оксидазоотрицателен, наличие каталазы.

Штамм 109 образовывал колонии размером до 1.2-1.5 мм, округлые, блестящие, гладкие, выпуклые, с ровным краем, однородной структуры, мягкой консистенции. Цвет колоний ярко-желтый. Выделял в среду пигмент. Мелкие неподвижные палочки. Клетки грамотрицательные. Аэробы. Оксидазо- и каталазоположительные.

Штамм 112 образовывал колонии размером до 1.2 мм, бежевого цвета, круглые, блестящие, слабовыпуклые, однородной структуры, мягкой консистенции, с ровным краем. Короткие палочки. Клетки грамотрицательные. Аэробы. Оксидазо- и каталазоположительные.

Тинкториальные и физиолого-биохимические свойства микроорганизмов

№ штамма	КОН	Оксидаза	Каталаза	Лизин	Аргинин	Ортинин	Амилолитическая активность	Протеолитическая активность	ОФ тест	Пигмент
108	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
109	-	+	+	-	+	-	+	+	+	Сине-зеленый
112	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-
114	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
102	-	+	+	-	+	-	-	-	+	Желто-зеленый
90	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-

Штамм 114 образовывал средние и крупные колонии размером до 3.0-3.5 мм, молочного цвета, круглые, блестящие, выпуклые, однородной структуры, мягкой консистенции, подвижные короткие палочки. Клетки грамотрицательные. Аэробы. Оксидазоотрицательные и каталазоположительные.

После определения основных физиолого-морфологических характеристик штаммов была проведена их молекулярно-генетическая идентификация. При секвенировании амплифицированного фрагмента гена 16S рРНК получены следующие нуклеотидные последовательности размером: у штамма 108 – 1 136 п.н., 102 - 1 429 п.н., 109 - 1 383 п.н., 112 – 1098 п.н., 90 - 1200 п.н., 114 - 1055 п.н. Сравнительный анализ секвенированной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штаммов с референтными нуклеотидными последовательностями из международных баз данных GenBank и RDP10 выявил их максимальное сходство с нуклеотидной последовательностью гена 16S рРНК представителей рода *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*. Видовые названия приведены в таблице 9.

Таблица 9

Идентификация выделенных штаммов

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

В результате были идентифицированы эндофитные и ризосферные штаммы микроорганизмов, которые, по литературным данным, являются характерными представителями почвенной среды, загрязненной нефтяными углеводородами, и способны к утилизации углеводородных загрязнений.

Таким образом, в результате проведенных исследований было выделено 60 ризосферных и эндофитных бактерий потенциально способных к биодegradации нефти. Путем скрининга выявлено 6 наиболее перспективных штаммов, которые за 2 мес культивирования утилизировали около 50 % нефти. Все они были способны расти при высоких (до 20 %) и очень высоких (50 %) концентрациях нефти в питательной среде. Были составлены и проверены различные ассоциации бактерий на способность разлагать нефть в жидкой питательной среде. Показано, что убыль нефти через 2 мес культивирования была на уровне 25-30 %. Также проведена серия экспериментов по оценке убыли нефти ассоциациями микроорганизмов при низких положительных температурах 4 и 10 °С. Установлено, что при температуре близкой к нулю разложение нефти практически не происходило. В то же время при незначительном повышении температуры скорость деструкции повышалась. Совместно с институтом микробиологии НАН Беларуси проведена молекулярно-генетическая идентификация на основе анализа последовательности гена 16S рРНК. Выбранные штаммы принадлежат к родам *Rhodococcus* (108), *Pseudomonas* (90, 102, 109), *Acinetobacter* (112, 114).

3.2 Пути деструкции ароматических углеводородов нефти бактериями - нефтедеструкторами

Для более эффективного использования микроорганизмов-деструкторов при биоремедиации, необходимо понимание путей, по которым нефть разлагается в природных условиях. Среди всех компонентов нефти наиболее эффективно проходит микробная деструкция алкановой фракции. Ее разложение протекает по пути β-окисления жирных кислот (Скрябин и др., 1976), поскольку большинство микроорганизмов обладает набором ферментов, реализующих этот путь. Высокомолекулярные гетероатомные соединения – асфальтены, относятся к наиболее трудно разлагаемым компонентам нефти, которые практически недоступны для действия

микроорганизмов. При биотрансформации нефти в почве асфальтены либо сохраняются в неизменном виде, либо включаются в состав гумуса в виде отдельных блоков, либо сорбируются в гумусовом горизонте, прочно цементируя пространство почвы (Шамраев и др., 2009). Наиболее токсичной является ароматическая фракция. Для микробной деструкции расщепления этих соединений микроорганизм-деструктор должен обладать определенным набором оксигеназных ферментов. Возможно, бактерии, способные разлагать ароматическую фракцию нефти, будут способны деградировать и сложно разлагаемые полиароматические углеводороды (ПАУ). Поэтому целью этого раздела работы стало определение в культуральной жидкости бактерий-нефтедеструкторов состава низкомолекулярных фенольных соединений, что позволит понять пути биodeградации ароматических углеводородов нефти.

Как известно, при действии ферментов ароматические соединения, например, нафталин и фенантрен, катаболизируются в основном по двум путям (через пирокатехин и протокатеховую кислоту) до одноядерных фенолов, а затем до ациклических углеводородных соединений, растворимых в воде (Patel et al., 1974; Пунтус и др., 2008). Для каждого из этих путей характерны реперные соединения, обнаружение которых в культуральной жидкости исследуемых микроорганизмов свидетельствует о том или ином пути деградации ароматических соединений. Присутствие в культуральных средах пирокатехина и протокатеховой кислоты может указывать на существование у бактерий одновременно двух путей деградации фенантрена и нафталина (Krishnan et al., 2004; Пунтус и др., 2008).

Полученный состав ароматических соединений, при ВЭЖХ экстрактов культуральных жидкостей шести эндосферных и ризосферных штаммов бактерий, приведен в таблице 10.

Состав ароматических соединений, обнаруженных в культуральных жидкостях различных штаммов бактерий после культивирования на сырой нефти

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

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

Оказалось, что для всех этих штаммов характерно присутствие салициловой кислоты. Это свидетельствовало о том, что бактерии деградировали ароматические соединения по пути образования пирокатехина. Однако пирокатехин был обнаружен только у двух штаммов (108, 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 (Patel et al., 1974). Его отсутствие в культуральной жидкости штаммов 90, 102, 109, 112 и в определенные периоды роста штаммов 108 и 114 можно было объяснить высокой скоростью его расщепления до ациклических соединений.

Также, как и пирокатехин, протокатеховая кислота образовывалась в различные периоды культивирования штаммов 108, 112 и 90, что свидетельствовало о существовании у них наряду с первым путем деградации полициклических ароматических соединений второго пути, в результате которого образовывался промежуточный метаболит – *o*-фталевая кислота (Пунтус и др., 2008).

В культуральных жидкостях изучаемых бактерий присутствовали такие соединения, как *p*-оксибензойная, ванилиновая и сиреневая кислоты (табл. 10). Это обусловлено наличием у бактерий оксидаз, участвующих в гидроксировании ароматического ядра бензойной кислоты (Patel et al., 1974; Пунтус и др., 2008), присутствующей в составе нефти. Среди метаболитов всех штаммов появлялась *n*-кумаровая, а у штамма 108 еще и феруловая кислота (табл. 10). Они могли образовываться из коричной кислоты вследствие окисления бактериями коричневого альдегида и спирта, присутствующих в составе нефти. В культуральной жидкости штаммов 112, 114 и 102 была обнаружена гентизиновая кислота (табл. 10), что, по-видимому, связано с окислением салициловой кислоты (Пунтус и др., 2008). В культуральной жидкости всех 6 штаммов присутствовал *o*-ванилин (табл. 10), пути образования, которого остаются не выясненными. Следует

отметить, что в течение 8 нед. роста каждого из штаммов состав идентифицированных соединений, перечисленных выше, как и их содержание, не были постоянными. Результаты анализа этих изменений свидетельствовали 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, обладающие максимумами поглощения в области 250–310 нм и периодом выхода при ВЭЖХ 7–17 мин, не были идентифицированы. Их состав у всех штаммов варьировал в разные периоды роста в течение 8 нед (рис. 10). Анализ хроматограмм ВЭЖХ с помощью библиотеки спектров “БД-2003-500” для “Милихром А-02” указывал на то, что часть этих компонентов относится к соединениям нафталинового ряда, а часть – к соединениям неизвестной структуры. Сравнение деструктирующей активности штаммов можно провести по продуктам, отнесенным к ароматическим соединениям, образующимся при жизнедеятельности бактерий. Оказалось, что штаммы 108, 112 и 114 являлись деструкторами нефти, а штаммы 102, 90 и 109, относящиеся к роду *Pseudomonas*, – содеструкторами (рис. 10).

Таким образом, были установлены основные метаболиты, образующиеся при разложении ароматических соединений штаммами 90, 102, 108, 109, 112 и 114. Показано, что для каждого штамма характерен один основной путь деградации ароматических соединений с образованием салициловой кислоты и пирокатехина. При росте штаммов 112 и 114, относящихся к виду *Acinetobacter guillouiae* в культуральной жидкости были обнаружены соединения, присутствие которых свидетельствовало о различных путях деструкции ароматических соединений этими двумя штаммами. Так, в культуральной жидкости штамма 112 присутствовала, наряду с салициловой, и протокатеховая кислота. У штамма 114 разложение ароматических соединений протекало только по одному пути с образованием салициловой кислоты и ее производного – пирокатехина.

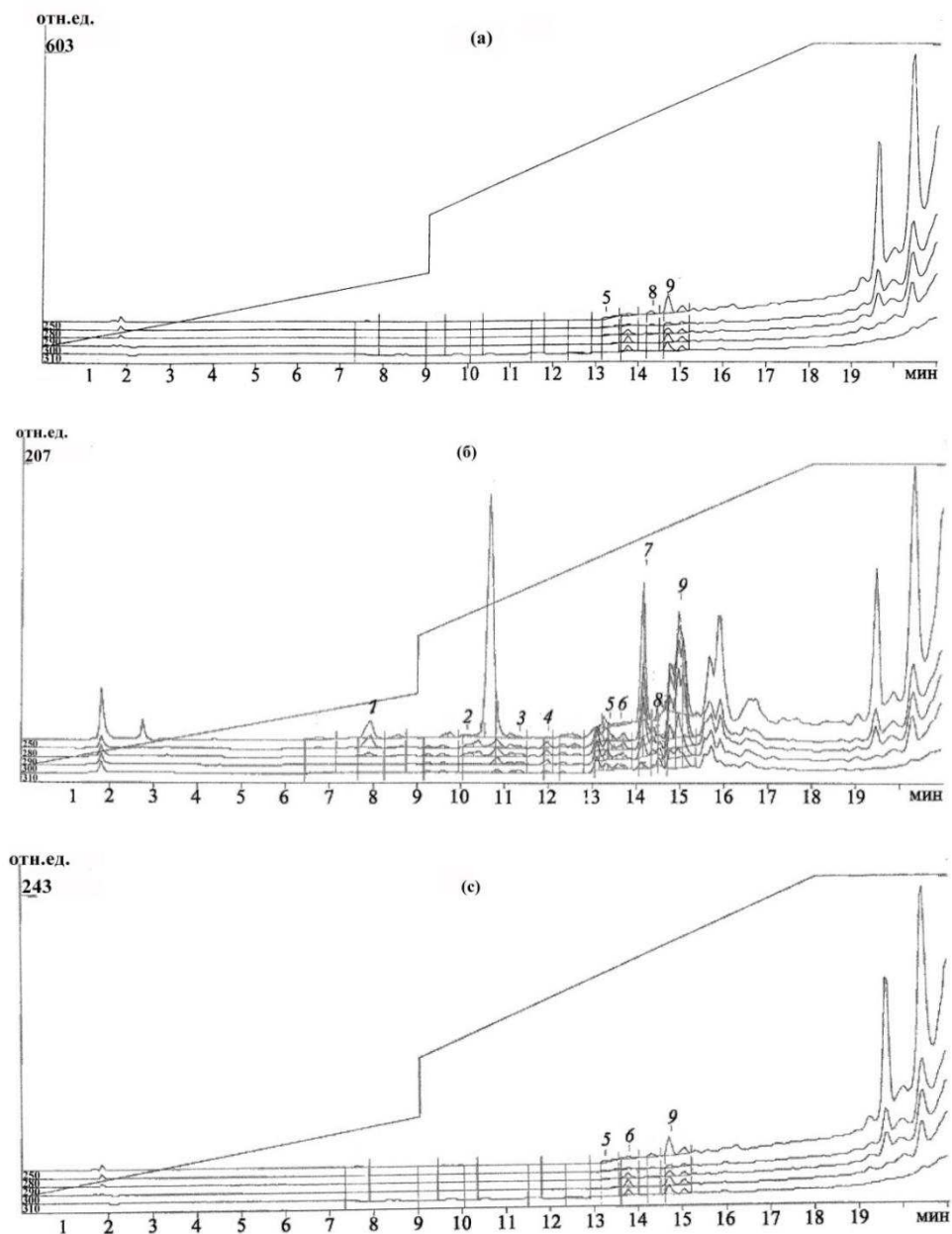


Рис. 10. ВЭЖ-хроматограммы: (а) - для экстрактов из контрольной среды без внесения бактерий, (б) и (с) - для экстрактов штаммов *Rhodococcus erythropolis*(108) и *Pseudomonas oryzaehabitans* (102), полученных на 8 неделе наблюдений.

Обозначения соединений: 1- протокатеховая кислота; 2- сиреневая кислота; 3- *n*-кумаровая кислота; 4- феруловая кислота; 5- бензойная кислота; 6- салициловая кислота; 7- коричный спирт; 8 -коричная кислота; 9-коричный альдегид. По оси абсцисс – указано время выхода соединений, в мин.; по оси ординат указана интенсивность поглощения в условных единицах (отн.ед.).

При культивировании всех штаммов в результате окисления коричневого альдегида и коричневого спирта, присутствующих в составе нефти,

образовывались коричная, *n*-кумаровая, а в ряде случаев – феруловая кислоты (рис. 10а). Следует отметить, что в составе нефти присутствовала также бензойная кислота и ее производные: *n*-оксибензойная, ванилиновая, сиреневая, пирокатеховая и гентезиновая кислоты (рис. 10а). Это свидетельствовало о том, что оксигеназы изученных бактерий способны метаболизировать и более простые ароматические компоненты нефти. Схема биодegradации ароматических соединений нефти микроорганизмами-деструкторами представлена на рис. 11.

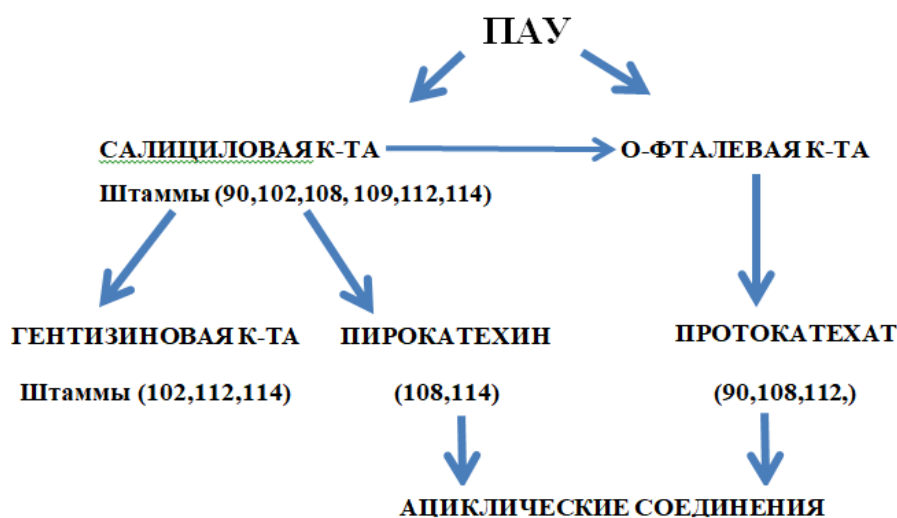


Рис.11. Пути биодegradации ароматических соединений нефти бактериями-нефтедеструкторами

Таким образом, были исследованы пути биодegradации ароматических углеводородов нефти шестью штаммами бактерий–нефтедеструкторов. Показано, что все изученные штаммы бактерий разлагали ароматические углеводороды с образованием конечного продукта, пирокатехина, а три из них - штаммы 90, 108 и 112 – дополнительно протокатеховой кислоты. В культуральной жидкости изученных штаммов были обнаружены феруловая, *n*-кумаровая, *n*-оксибензойная, ванилиновая и сиреневая кислоты, которые, по-видимому, образовались при метаболизме этими бактериями коричневого спирта, коричневого альдегида и бензойной кислоты, присутствующих в составе нефти.

3.3 Выживаемость растений в загрязненных почвах при внесении исследуемых ассоциаций

При попадании в почву микроорганизмы-нефтедеструкторы неизбежно вступают в контакт с растениями, произрастающими на загрязненных территориях. Их взаимодействие может быть различным. С одной стороны, бактерии-нефтедеструкторы могут способствовать снижению стрессового воздействия нефти и нефтепродуктов на растение, стимулировать его рост за счет непосредственного выделения внеклеточных биологически активных веществ, таких как фитогормоны, ферменты и др. (Белимов, 2008). Опосредованное воздействие микроорганизмов проявляется при разрушении нефтяной пленки, обволакивающей корневую поверхность, что улучшает дыхание растений и доступность питательных веществ, заблокированной пленкой нефти. С другой стороны, не исключено и подавление роста и развития растения за счет появления в непосредственной близости от корня токсичных низкомолекулярных продуктов распада нефти, образующихся вследствие деятельности бактерий-нефтедеструкторов (Запрометов, 1974).

Важным моментом до этапа промышленного использования штаммов-нефтедеструкторов в процессах очистки почв от нефтезагрязнений является получение данных о характере воздействия изучаемых штаммов на растения. В связи с этим следующим этапом работы было изучение влияния бактерий-нефтедеструкторов, выделенных из эндо - и ризосферы растений, на прорастание семян и развитие растения в условиях нефтезагрязнения.

Для изучения влияния эндосферных и ризосферных бактерий на развитие растения были проведены эксперименты на семенах редьки масличной (*Raphanus sativus* var. *oleiferus*).

В первую очередь определили рабочую концентрацию нефти для экспериментов. Для этого использовали 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 % нефти. Выяснилось, что при концентрации нефти 3 % рост и развитие растений значительно подавлялся. Концентрации 0.5 и 1 % не оказали негативного

воздействия на развитие растения. При концентрации 2 % нефти рост растения подавлялся примерно на 50 % (рис. 12). Для дальнейших экспериментов использовали эту концентрацию.

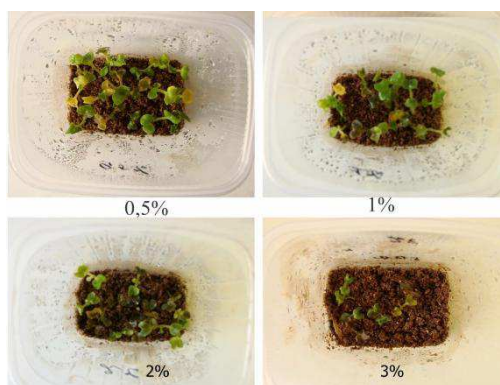


Рис. 12. Влияние различных концентраций нефти на развитие проростков редьки масличной через 14 сут выращивания

Так при обработке субстрата сырой нефтью в концентрации 2 % наблюдалось ингибирующее влияние на прорастание и рост семян растений. Всхожесть снижалась на 50 %, длина подземной и надземной части растения и масса проростков - на 60 % (рис. 13).



Рис.13. Влияние нефти в концентрации 2 % на рост и развитие редьки масличной через 14 сут выращивания

Из шести исследованных штаммов пять (90, 102, 109, 112, 114) не проявили какого-либо влияния на рост и развитие редьки масличной. Положительное влияние на растения оказал только штамм *Rhodococcus* (108). Обработка семян редьки масличной суспензией бактерий этого штамма повышала всхожесть на 25 % относительно контроля (рис. 14а), а у полученных из этих семян растений, наблюдалось увеличение длины корня -

на 50 % (рис. 14б), высоты надземной части и ее массы - на 40 % (рис. 14б, в). Это свидетельствовало о снижении ингибирующего действия нефти на растение. Эффект всех обсуждаемых выше воздействий нефти на растения редьки масличной представлен на рис. 15.

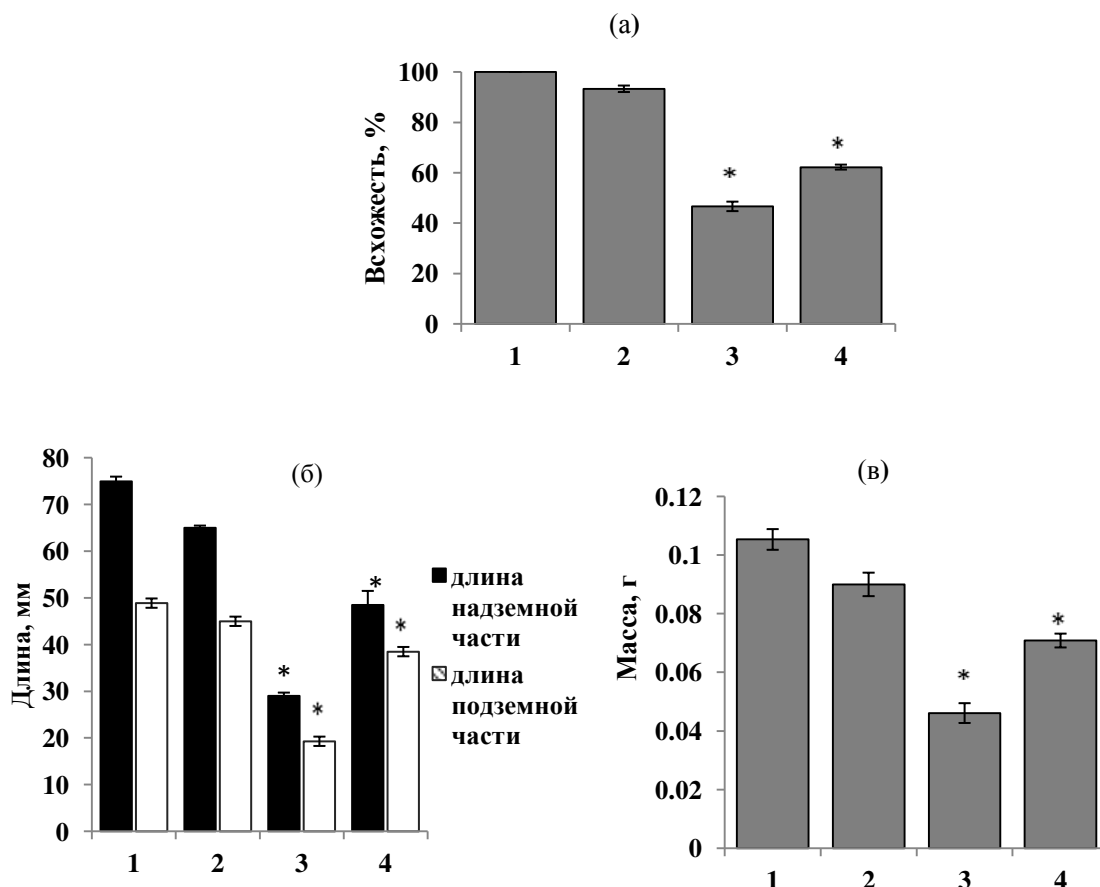


Рис.14. Влияние инокуляции бактерией на морфологические параметры редьки масличной при добавлении нефти: (а) всхожесть, (б) длина надземной части, длина подземной части, (в) масса проростков. (1) контроль без добавления нефти и бактерий, (2) *Rhodococcus erythropolis* (108) без нефти, (3) нефть без бактерий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

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



Рис. 15. Развитие редьки масличной при добавлении нефти и инокуляцией семян штаммом *Rhodococcus* (108). (1) контроль без добавления нефти и бактерий, (2) *Rhodococcus erythropolis* (108) без нефти, (3) *Rhodococcus erythropolis* (108) с нефтью (4) нефть без бактерий

Возможным механизмом данного положительного эффекта штамма может быть выделение внеклеточных биологически активных веществ, таких как фитогормоны. Возможно, происходило разрушение нефтяной пленки, обволакивающей корневые волоски, тем самым улучшалось дыхание растений. Также увеличению доступности нефти для контакта с клетками бактерий-нефтедеструкторов может способствовать синтез поверхностно-активных веществ (биосурфактантов). С целью проверки этих предположений был изучен микробный синтез фитогормонов и биологически-активных соединений у ризосферных и эндосферных микроорганизмов.

При оценке внеклеточных фитогормонов, как правило, используется метод биотестирования, так как важно не количественное содержание фитогормонов, а их биологическая активность. Выяснилось, что наибольшую гиббереллиноподобную активность проявил штамм 102, у которого скорость мобилизации глюкозы в эндоспермальном тесте соответствовала концентрации промышленных гиббереллинов 0.038 % (табл. 11).

Ауксиноподобную активность определяли по двум биологическим тестам и количественно.

Активность фитогормонов в супернатанте бактерий-нефтедеструкторов

Штамм	ГПА, % от контроля	Количество ауксинов, % от контроля	Биологическая активность (ауксиноподобная)		
			Число корешков фасоли, % от контроля	Высота образования корней у черешков фасоли, % от контроля	Всхожесть горчицы, % от контроля
102	0.038±0.002	0.003±0.0003	173.1±1.2	268.0±2.3	38
112	0.0074±0.0006	0.0015±0.0002	100.0	63.0±3.1	89
108	0	0.051±0.0009	110.0±1.4	245.6±3.2	14
114	0.0052±0.0003	0.0011±0.0001	89.8±1.3	103.5±2.1	93
109	0.0065±0.0003	0.0035±0.0003	220.5±1.8	301.8±1.8	34
90	0	следы	230.7±2.1	224.6±1.9	24

Примечание: контроль – культуральная среда без бактерий.

Оказалось, что штаммы 102 и 109 содержали около 0.03 % ауксинов и проявляли достаточно высокую активность в биотестах. Эти культуры относятся к роду *Pseudomonas*, который, согласно литературным данным (Асабина, 2009) обладает высокой приспособительной способностью и, соответственно, должен обладать большим разнообразием биологически-активных веществ. Культура 108, относящаяся к роду *Rhodococcus*, синтезировала большое количество ауксинов, однако их биологическая активность проявлялась не во всех биотестах.

Известно, что один и тот же фитогормон может быть активным в одном биотесте и совершенно неактивным в другом (Методы почвенной микробиологии и биохимии, 1991). Следует отметить, что нам не удалось

обнаружить ауксиноподобные вещества, определяемые реактивом Сальковского у культуры 90. В то же время, супернатант этого штамма характеризовался очень высокой активностью в биотестах на ауксины.

Первичная оценка способности микроорганизмов выделять поверхностно-активные вещества оценивалась по наличию эмульгирующей активности. Выяснилось, что только штамм 108 образовал стойкую эмульсию, индекс эмульгирования на среде с гексадеканом составил 73%, на среде с дизельным топливом 57 %. И показал самую высокую активность при добавлении на поверхность нефти супернатанта бактерий (табл. 12).

Таблица 12

Показатели способности бактерий-нефтедеструкторов выделять поверхностно-активные вещества

Штамм	Диаметр, образовавшихся чистых зон, см	Эмульгирующая активность жидких культур	Индекс эмульгирования, %		Показатель гидрофобности и клеток, %
			Гексадекан	Диз. топливо	
90	0.3±0.1	-	-	-	0
102	0.7±0.08	-	-	-	0
108	4.0±0.2	+	73	57	77.94±0.5
109	2.1±4.9	-	-	-	0
112	3.2±0.4	-	-	-	43.0±0.2
114	1.5±0.2	-	-	-	0

Еще одним показателем способности клетки микроорганизма взаимодействовать с нефтяными каплями является гидрофобность поверхности клеточной стенки. Она обеспечивает транспорт молекул углеводов внутрь клетки. Показатель гидрофобности клеточной стенки выявился только у штамма 108 (*Rhodococcus*) – 78 % и штамма 112 (*Acinetobacter*) – 43 % (табл. 12).

Наличие биосурфактантов у штамма 108 позволило нам предположить, что одним из возможных механизмов положительного влияния на

выживаемость растений в условиях нефтезагрязнения, может быть эмульгация нефтяной пленки с поверхности корней. Для подтверждения этой гипотезы было проведено исследование зоны корневых волосков с помощью световой микроскопии (рис. 16).

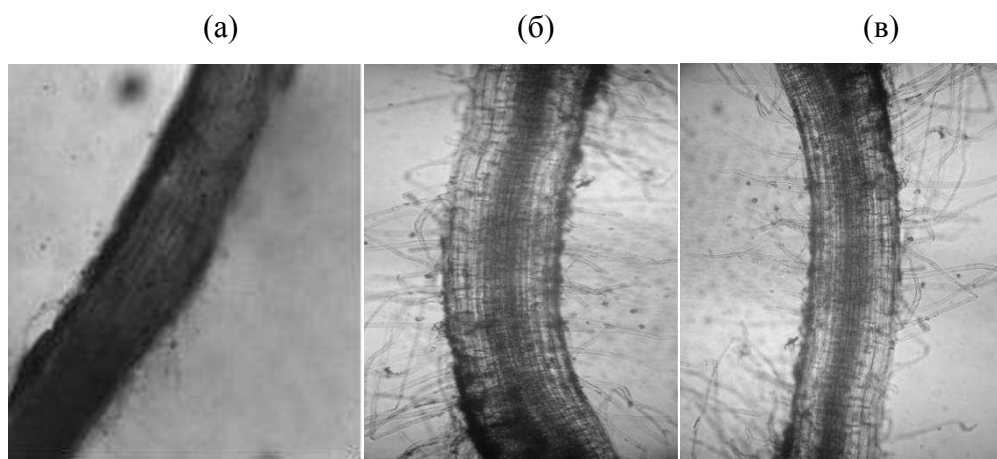


Рис. 16. Развитие корневой системы редьки масличной при добавлении нефти (а) нефть без бактерий, (б) нефть и добавление штамма 108, (в) контроль без добавления нефти и бактерий, x100.

У растений, выращенных в условиях нефтезагрязнения, эта зона была покрыта нефтяной пленкой, 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 микробных клеток, вероятно, адсорбирующихся на корнях (рис.17).

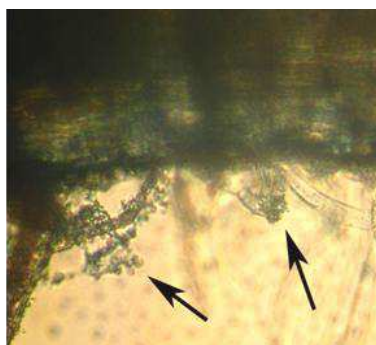


Рис.17. Скопление микроорганизмов на корневых волосках редьки масличной, x200.

Таким образом, изучение влияния бактерий-нефтедеструкторов, выделенных из эндо- и ризосферы растений на развитие растений редьки масличной в условиях нефтезагрязнения показало, что из шести изученных штаммов только один штамм 108, относящийся к роду *Rhodococcus*, проявил наилучшие фитозащитные свойства. Этот штамм оказался активным продуцентом биосурфактантов, способствующих разрушению нефтяной пленки на поверхности корня, тем самым освобождая корневые волоски. В дополнение к указанному свойству у данных бактерий выявили синтез значительного количества ауксинов, очевидно, также способствующих усилению роста растения. Всхожесть семян возрастала на 25, биомасса растений – на 40 %. Тем самым, штамм 108 оказался способен не только активно разрушать нефть, но и выделять активные вещества, повышающие выживаемость растений в условиях нефтезагрязнения.

Результаты, представленные в главах 3 - 5 указывают на то, что микроорганизмы, обитающие в нефтезагрязненных почвах, могут осваивать разные стратегии выживания, которые могут сочетаться друг с другом в разных соотношениях. Первая стратегия - это развитие мощных специфических ферментных систем, способных трансформировать различные виды углеводов. Среди исследованных штаммов в наиболее явном виде такой стратегии придерживается *Acinetobacter guillouiae* (114). Этот штамм обладает наиболее высокой способностью утилизировать нефть даже при низких положительных температурах, используя небольшое (как в случае с ПАУ) число метаболических путей. При этом микроорганизм не способен эмульгировать гидрофобную фазу.

Вторая стратегия (штамм *Rhodococcus erythropolis*) предполагает синтез биосурфактантов, которые снижают токсичность углеводов за счет эмульгирующей активности и высокого показателя гидрофобности. При этом ферментные системы более разнообразны (два альтернативных пути). Подобная стратегия выгодна не только для микроорганизмов, но и для растений, в ризосфере которых эти микроорганизмы обитают.

Наконец, штамм *Acinetobacter guillouiae* (112) придерживается смешанной стратегии. Имеет достаточно высокую активность по отношению к углеводородам нефти, способен к росту при высокой концентрации нефтепродуктов, но при этом имеет два альтернативных пути окисления ароматических соединений и отличный от нуля показатель гидрофобности, хотя не обладает эмульгирующей активностью.

3.4 Изменение биологических свойств почвы загрязненной сырой нефтью при внесении ассоциаций микроорганизмов

При поступлении нефти и нефтепродуктов в почву отмечается снижение плодородия, ухудшение экологического состояния и их функций в биосфере. Для ускорения процесса очистки нефтезагрязненных почв применяют углеводородокисляющие микроорганизмы, которые за более короткие сроки способны разлагать нефтяные углеводороды до безопасных соединений таких как CO₂ и H₂O (Винокуров и др., 2013).

Оценка перспективности использования выделенных аборигенных штаммов для восстановления нефтезагрязненных почв стала следующим этапом нашей работы. В условиях модельного эксперимента изучали показатели биологической активности почвы в вариантах с внесением нефти и выделенных нами штаммов. Подобные исследования (Шаркова, 2010; Киреева и др., 2010; Ибатуллина и др., 2011; Овсянникова и др., 2014), позволяют определить эффективность микроорганизмов-нефтедеструкторов для целей биоремедиации почв, загрязненных нефтью. Для характеристики биологической активности используются следующие интегральные показатели: фитотоксичность почвы, изменение ферментативной и дыхательной активности почвы и общей численности почвенной микрофлоры (Плешакова и др., 2011; Сулейманов и др.; 2012, Кириенко др., 2015).

Исследование фитотоксичности почвенного раствора. Классическим методом анализа степени токсичности почвы является определение ее

фитотоксичности, так как загрязненная почва становится опасной не только для почвенной микрофлоры, но и для произрастающих на ней растений (Терехова, 2011). В процессе биодеструкции нефти образуется большое количество соединений, токсичность которых выше чем у нефти, поэтому определение уровня фитотоксичности может служить косвенным показателем активности разложения нефти в почве. Фитотоксичность в данном эксперименте не зависела от физико-химических свойств почвы, так как методика эксперимента была основана на оценке прямого токсического эффекта почвенной вытяжки.

Для оценки фитотоксичности были использованы семена растений, относящихся к разным таксономическим группам и с разным размером семени, 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. Проведенные опыты показали, что семена редиса оказались наиболее чувствительными к воздействию нефти. Отмечено, что через две недели после внесения сырой нефти в почву происходило резкое снижение их всхожести (рис. 18).

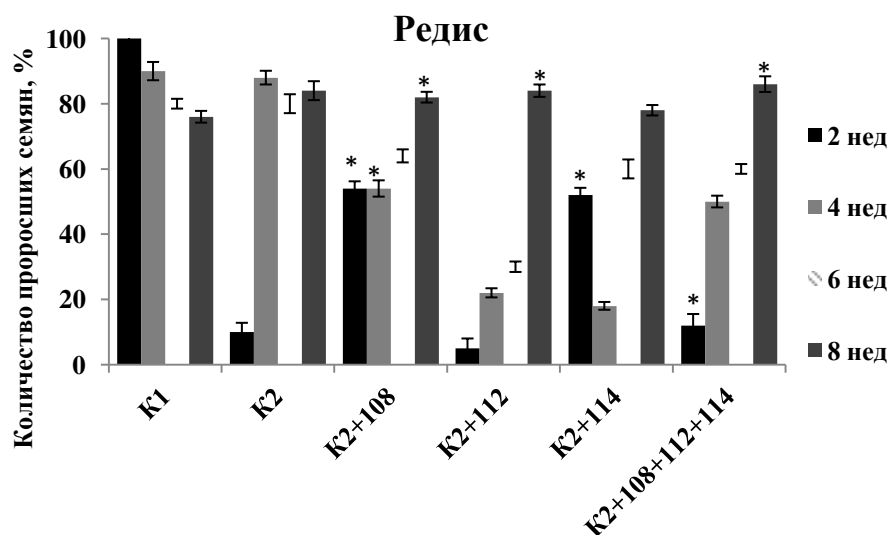


Рис. 18. Определение фитотоксичности почвенного раствора.

K1 - незагрязненная почва, K2 - почва, загрязненная нефтью без бактерий.

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

Однако во всех последующих измерениях всхожесть семян практически не отличалась от контроля. Возможно, в первые две недели эксперимента токсический эффект оказала быстро разлагаемая фракция нефти. Основные компоненты нефти оставались неизменными, о чем может свидетельствовать отсутствие фитотоксичности.

Обработка нефтезагрязненной почвы отдельными штаммами бактерий-нефтедеструкторов существенно изменяла ее фитотоксичность. Наиболее высокая фитотоксичность была обнаружена после обработки почвы штаммом *Acinetobacter1* sp. (112). Ранее было установлено, что этот штамм обладал высокой скоростью биодеструкции модельных соединений нефти (раздел 3.1.). Снижение фитотоксичности происходило только к концу эксперимента.

Максимальный токсический эффект почвы, обработанной *Acinetobacter2* sp. (114) наблюдался через четыре недели. Несмотря на принадлежность этих штаммов к одному виду, они используют разные пути разложения ароматических соединений нефти (раздел 3.2). Мы предполагаем, что этим объясняются различия в динамике фитотоксичности почвы. Наименьшей фитотоксичностью на протяжении всего эксперимента обладала почва, обработанная штаммом *Rhodococcus* sp. (108). Как было показано, что этот штамм микроорганизмов оказывает защитное действие на растения в условиях нефтезагрязнения. Мы связываем это с его способностью синтезировать биосурфактанты (раздел 3.3).

В случае использования консорциума микроорганизмов в первые две недели происходило резкое увеличение фитотоксичности почвы, затем она постепенно снижалась. Через восемь недель после внесения нефти и бактерий фитотоксичность практически не отличалась от контроля (см. рис.18).

Результаты, зафиксированные для пшеницы были аналогичными. Влияние нефтезагрязнения на всхожесть гороха оказалось незначительным и сдвигалось на более поздние сроки после внесения нефти (рис.19).

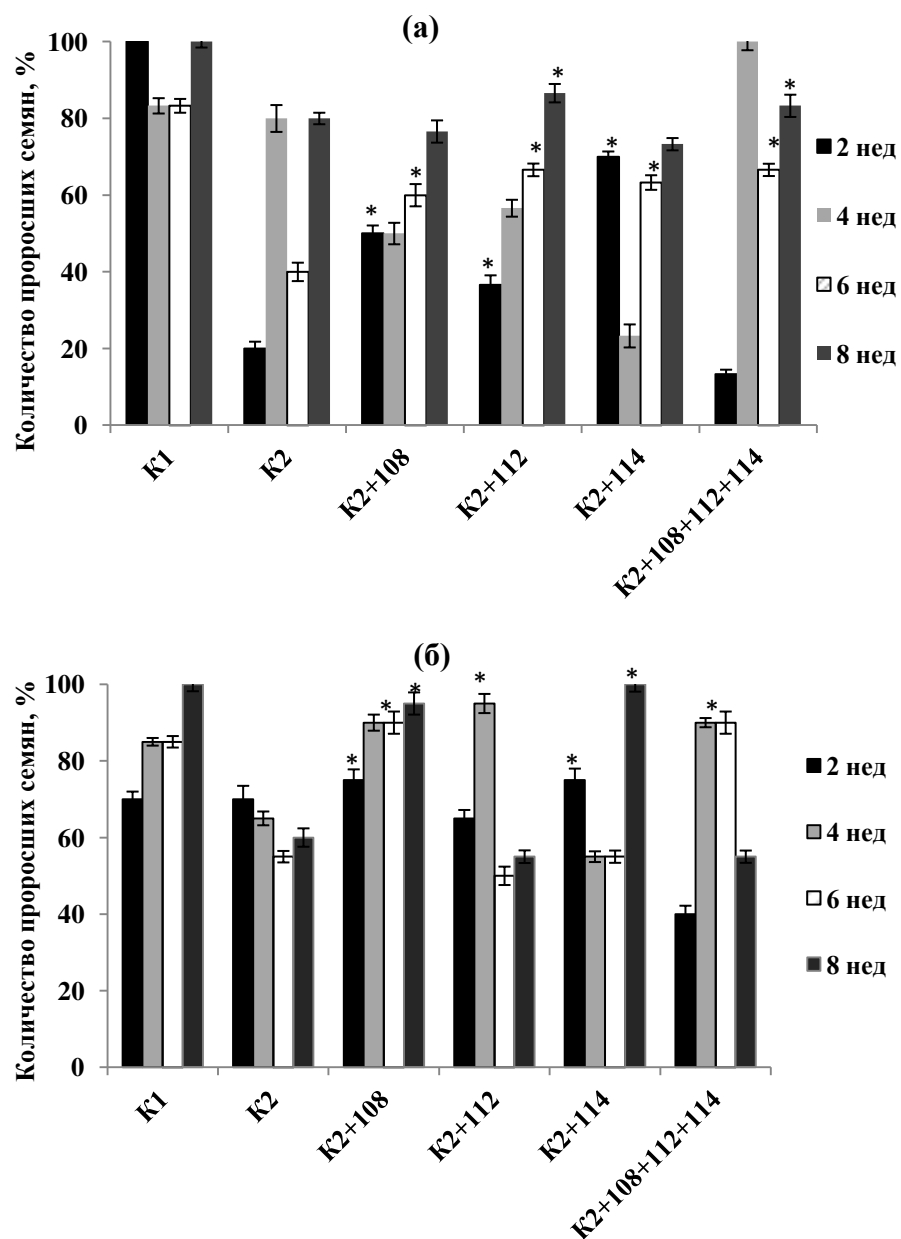


Рис. 19. Определение фитотоксичности почвенного экстракта:

(а) пшеница, (б) горох, $n=3$. K1 - незагрязненная почва, K2 - почва, загрязненная нефтью без бактерий.

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

Таким образом, полученные результаты показали, что фитотоксичность загрязненной нефтью почвы тем выше, чем меньше размер семян. Наиболее чувствительными к нефтезагрязнению оказались семена редиса. Проявление фитотоксичности почвы также зависело от срока загрязнения. Негативный эффект больше выражен в первые дни после внесения нефти. Выделенные штаммы микроорганизмов-нефтедеструкторов в основном способствовали снижению фитотоксичности почвы на начальном этапе восстановления.

Наиболее эффективной оказалась обработка почвы штаммом *Rhodococcus* sp. (108). В варианте с внесением штамма *Acinetobacter*1 sp. (112), напротив, фитотоксичность почвы усиливалась.

Изучение ферментативной активности почв. Для оценки эффективности процессов биоремедиации часто используют показатели пероксидазной, каталазной и полифенолоксидазной активности (Логинова, 2011). Пероксидаза (ПО) – фермент, осуществляющий окисление органических веществ почв за счет кислорода воздуха и перекиси водорода; его влияние направлено на окисление гумусовых веществ, которые, как и нефть, являются углеводородами. Полифенолоксидаза (ПФО) участвует в превращении органических соединений ароматического ряда в компоненты гумуса. Каталазная активность характеризует интенсивность окислительно-восстановительных процессов, может быть использована в качестве показателя экологического состояния и критерия восстановления функции почв (Полянскова, 2011). В условиях загрязнения почвы нефтью каталаза способствует разложению углеводов, разрушая пероксид водорода, образующийся в процессе жизнедеятельности микроорганизмов, до необходимого для этой реакции кислорода.

Установлено, что незагрязненная почва практически не обладала пероксидазной активностью, а активность полифенолоксидазы и каталазы находилась на среднем уровне (рис. 20). Через пять сут после внесения нефти в почву активность исследуемых ферментов резко увеличивалась. По-видимому, это связано с активизацией почвенной микрофлоры, вынужденной в короткие сроки нейтрализовать большое количество токсичных соединений. Через два месяца эксперимента активность ферментов снижалась.

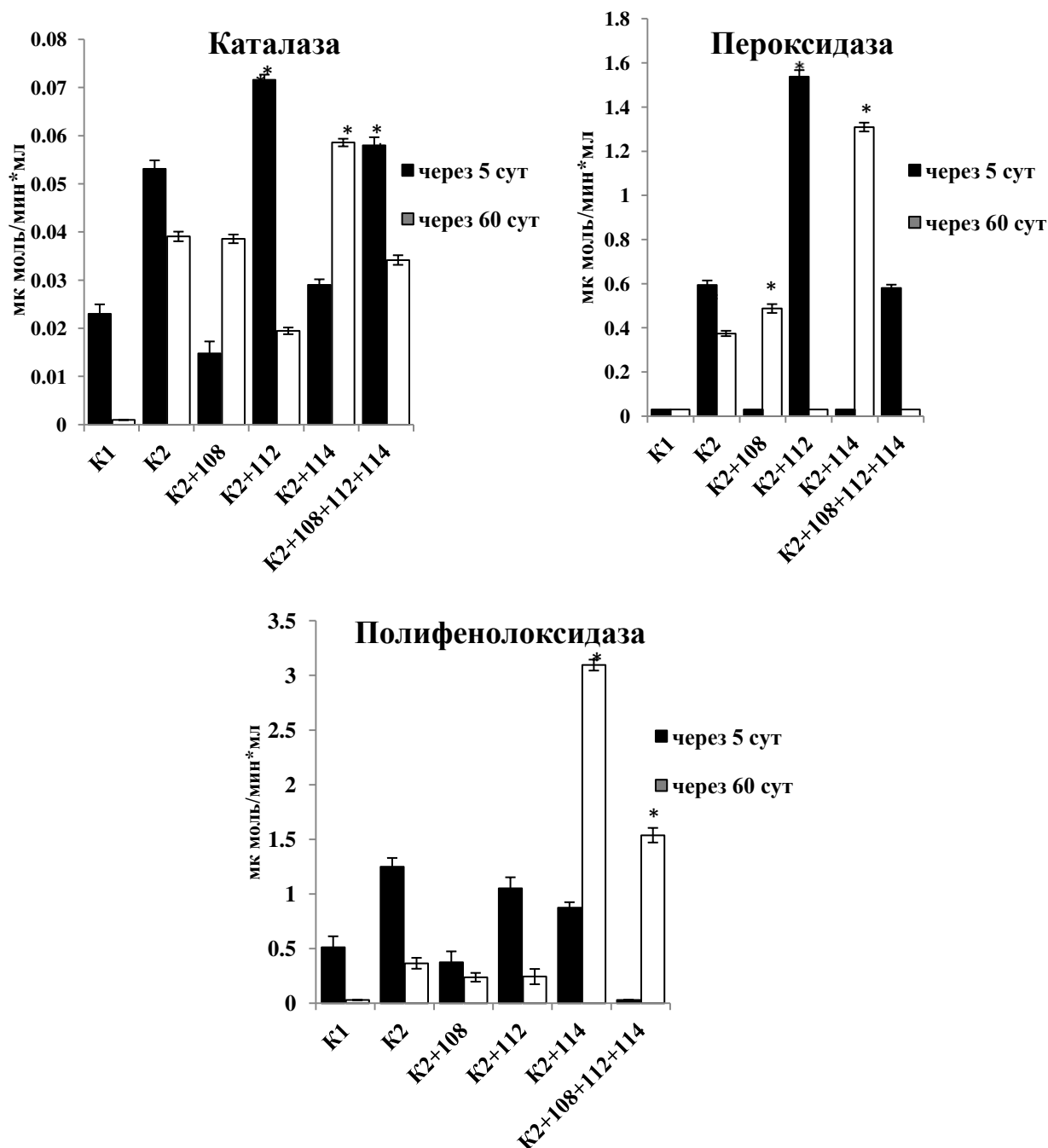


Рис. 20. Определение ферментативной активности почвы.

K1 - незагрязненная почва, K2 - почва, загрязненная нефтью без бактерий.

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

Обработка загрязненной почвы штаммом *Acinetobacter1* sp. (112) приводила к возрастанию активности всех трех ферментов. Примерно в это же время наблюдалась максимальная фитотоксичность. Вероятно, в этом случае происходило активное разложение ароматической составляющей нефти, что способствовало выделению в водную фазу большого количества

низкомолекулярных фенольных веществ, токсичных для растений. Эти соединения являются продуктами и субстратами исследуемых ферментов, что объясняет увеличение их активности. Этот процесс с течением времени угасает. При внесении штамма *Acinetobacter2* sp. (114) наблюдалась обратная картина. Максимальная активность ферментов приходилась на конец исследования. Возможно, это связано с различными путями деструкции компонентов нефти этими микроорганизмами (раздел 3.2). Внесение в нефтезагрязненную почву штамма *Rhodococcus* sp. (108) практически не изменяло активность ферментов. Введение консорциума микроорганизмов (108+112+114) увеличивало активность пероксидазы и каталазы аналогично действию штамма *Acinetobacter1* sp. (112), однако активность полифенолоксидазы увеличивалось лишь к концу эксперимента.

Таким образом, активность всех изученных оксидоредуктазных ферментов при загрязнении почвы нефтью возрастала на начальном этапе ее воздействия, что связано, вероятно, с поступлением ароматических соединений, являющихся их субстратами. Впоследствии она снижалась, сохраняясь на сравнительно высоком уровне к концу эксперимента. Действие внесенных в почву штаммов микроорганизмов зависело от их видовой специфичности. Внесение штамма *Acinetobacter1* sp. (112) способствовало усилению каталазной и пероксидазной активности, но только на начальных этапах эксперимента. Применение штамма *Acinetobacter2* sp. (114), напротив, способствовало усилению активности всех ферментов к концу эксперимента. Соотнесение активности ферментов с фитотоксичностью свидетельствует о сопряженности процессов происходящих в почве. Максимальная ферментативная активность соответствовала периоду максимальной фитотоксичности почвы.

Исследование микробного спектра почвы. Изучение суммарной ферментативной активности неотделимы от исследования микробного спектра почвы. В исследуемых вариантах опыта были определены отдельно количество бактерий, грибов и актиномицетов, что позволило оценить общее

количество микроорганизмов. Выявлено, что структура микробного сообщества незагрязнённой почвы была представлена большей частью бактериями, затем грибами и в меньшей степени актиномицетами. Загрязнение почвы нефтью привело к значимому увеличению ($p \leq 0,05$) всех перечисленных групп микроорганизмов уже через пять суток после внесения, что можно связывать с активизацией аборигенной углеводородокисляющей микрофлоры. Через два месяца численность гетеротрофных бактерий и грибов достоверно снижалась, тогда, как количество актиномицетов возросло. Увеличение количества актиномицетов в загрязненной нефтью серой лесной почве также показано в работе Е.А. Полянской (2011). Существенные перестройки в структуре почвенного сообщества свидетельствуют об его переходе в зону стресса (Гузев, Левин, 1991).

Внесение в загрязненную почву штамма *Rhodococcus* sp. (108) способствовало увеличению общего количества микроорганизмов в почве ($p \leq 0,05$). Повышенную численность бактерий и актиномицетов наблюдали при внесении штаммов *Acinetobacter1* sp. (112) и *Acinetobacter2* sp. (114). При внесении консорциума микроорганизмов 108+112+114 произошло увеличение количества бактерий, а количество грибов и актиномицетов снижалось ($p \leq 0,05$) (рис. 21).

Таким образом, внесение нефти в почву способствовало перераспределению в структуре сообщества почвенных микроорганизмов при возрастании общего их количества, что может быть связано с использованием нефти в качестве дополнительного источника углерода. Внесение в загрязненную почву исследуемых штаммов микроорганизмов способствовало перестройки микробного спектра, связанную преимущественно со стимулированием роста бактерий. При добавлении в загрязненную среду консорциума микроорганизмов, микробный спектр не отличался от незагрязненной почвы, что можно рассматривать как восстановление почвенных популяций и выход микроорганизмов из зоны стресса (Гузев, Левин, 1991).

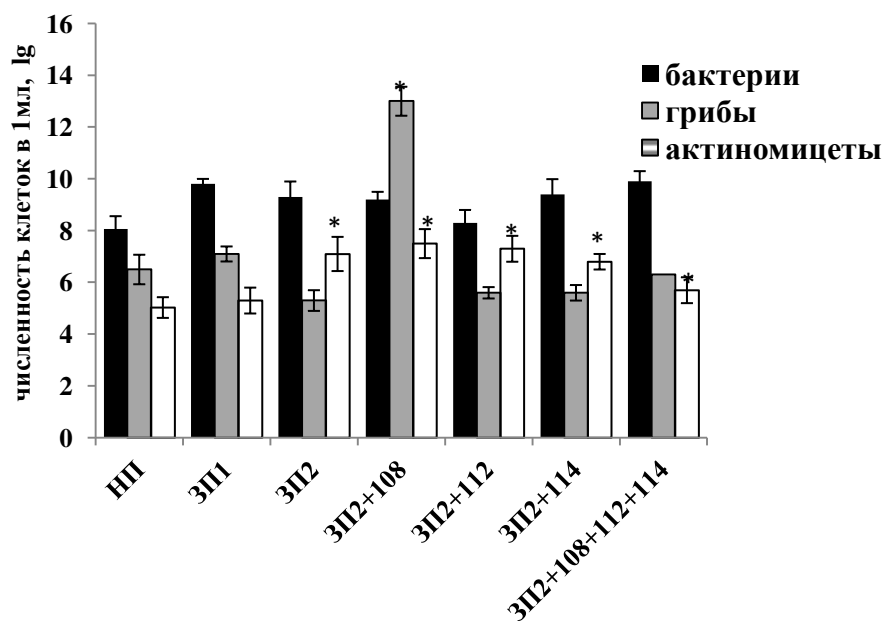


Рис. 21. Исследование микробного спектра почвы.

НЗ - незагрязнённая почва; ЗП1 - загрязнённая нефтью (через 5 сут), ЗП2 - загрязнённая почва через 60 сут без бактерий.

Примечание: звездочкой показаны достоверные различия показателя от ЗП1, при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Эмиссия CO_2 . Под дыханием почвы понимают интенсивность эмиссии углекислого газа из почвы, которая определяется скоростью процессов биодеструкции органического вещества (Ахмадиев и др., 2012). Поскольку CO_2 является конечным продуктом разложения нефти, то по показателю интенсивности дыхания можно судить о процессе восстановления почвы в ходе ее очистки.

Как видно из рис. 22, показатель эмиссии CO_2 в незагрязненной почве в течение всего эксперимента снижался от 0,021 до 0,002 $CO_2/$ мг в час, что характерно для инкубационных экспериментов (Благодатская и др., 2016). Загрязнение почвы сырой нефтью через 5 сут не влияло на величину эмиссии CO_2 , однако в последующие дни эксперимента происходило повышение уровня дыхания почвы в среднем в 2,5 раза. По-видимому, за счет увеличения содержания доступного для микробоценоза органического углерода, активизировалась аборигенной микрофлоры. Подтверждением является увеличение общего количества микроорганизмов в этом варианте

(см. рис. 22). Внесение в загрязненную почву *Rhodococcus* sp. (108) стимулировало эмиссию углекислого газа на 74 % относительно загрязненной нефтью почвы. Интенсивность дыхания для этого варианта была максимальной среди всех образцов на протяжении всего эксперимента. Высокую дыхательную активность отмечали при внесении в почву штамма *Acinetobacter2* sp. (114) и консорциума микроорганизмов (108+112+114), что указывает на процесс деструкции углеводородов нефти. Внесение штамма *Acinetobacter1* sp. (112), напротив, способствовало подавлению эмиссии CO₂ относительно загрязненного нефтью варианта.

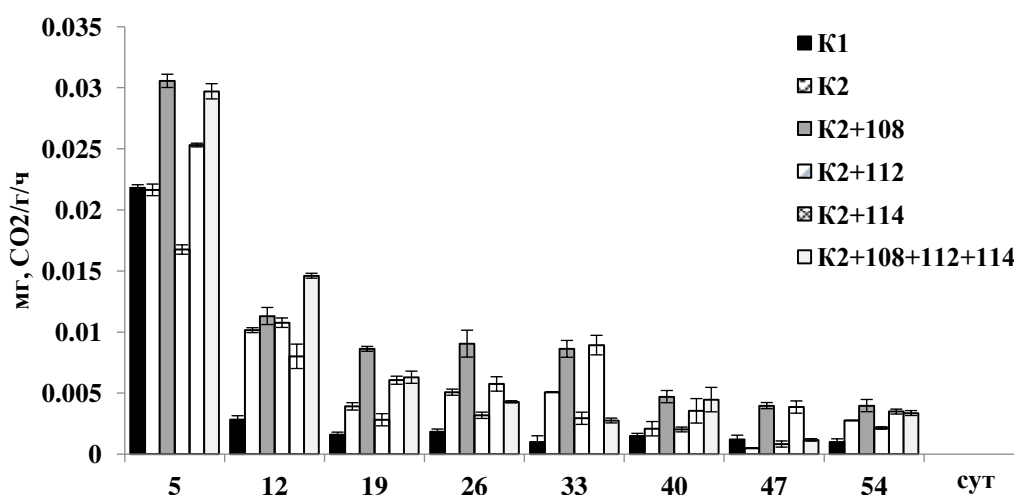


Рис. 22. Интенсивность эмиссии CO₂. K1- незагрязненная почва, K2-внесение нефти без бактерий

Таким образом, под влиянием нефти уровень интенсивности выделения CO₂ был выше относительно незагрязненной почвы на протяжении всего эксперимента, что связано, по-видимому с активизацией аборигенной микрофлоры. Внесение выделенных штаммов в основном усиливало интенсивность выделения углекислого газа. Наибольшую интенсивность дыхания показали штаммы *Rhodococcus* sp. (108), *Acinetobacter2* sp. (114), консорциум микроорганизмов (108+112+114), которые в процессе биодеструкции осуществляли минерализацию органических компонентов нефти до ее конечного продукта - углекислого газа.

Деструкция углеводов нефти микроорганизмами в почве. Одним из основных показателей очищения почв от нефтезагрязнения является остаточное содержание нефти. Показано, что в загрязненной почве остаточное содержание нефти за 60 сут эксперимента составило около 60 %. Внесение штаммов в загрязненную почву способствовало ускорению разложения нефти в почве. При внесении штамма *Rhodococcus* sp. (108) остаточное содержание нефти составило 35 %, у штамма *Acinetobacter* 2 sp. (114) – 34 %, *Acinetobacter* 1 sp. (112) – 32 %, консорциума микроорганизмов *Rhodococcus* + *Acinetobacter* 1 + *Acinetobacter* 2 (108+112+114) – 38 % (рис. 23).

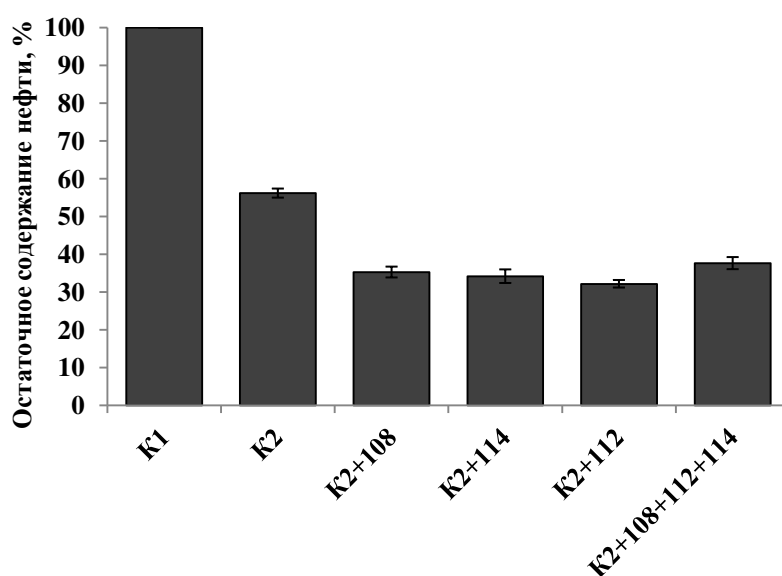


Рис. 23. Остаточное содержание нефти в почве за 60 сут эксперимента.

K1 - исходное содержание нефти, K2 - внесение нефти в почву без бактерий

В результате обобщения полученных результатов установлено, что внесение в загрязненную нефтью почву микроорганизмов-нефтедеструкторов приводит к ускорению разложения нефти, о чем свидетельствует изменение биологических свойств почвы: активности ферментов, количества микроорганизмов, уровня дыхания и фитотоксичности. В зависимости от характеристик внесенного микроорганизма возможно либо увеличение токсичности нефти на пике ее разрушения, либо снижение токсичности за счет выделения микроорганизмами защитных веществ (биосурфактантов).

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нефть и нефтепродукты являются опасными загрязнителями окружающей среды в связи с их интенсивной добычей и переработкой. Неизбежные потери, связанные, прежде всего, с аварийными ситуациями на нефтедобывающих площадках и нефтепроводах являются серьезной проблемой и для Иркутского региона.

При ремедиации загрязненных нефтью почв используют физические, термические, химические и биологические методы. Последний метод является недорогим и экологически безопасным, поэтому он наиболее перспективен. При биоремедиации почв важным моментом является применение аборигенных микроорганизмов, которые, в отличие от интродуцированных, хорошо вписываются в микробный пейзаж почвы.

В результате наших исследований из эндосферы и ризосферы растений были выделены аборигенные углеводородокисляющие микроорганизмы. Для отбора наиболее эффективных нефтедеструкторов проведен скрининг, в результате которого было выявлено шесть штаммов, наиболее активно утилизирующих сырую нефть. Идентификация на основе анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК показала, что штаммы принадлежат к родам *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*. Данные штаммы были депонированы Всероссийской коллекцией микроорганизмов ИБФМ им. Г.К. Скрыбина. Была установлена способность штаммов-деструкторов выживать при высоких концентрациях нефти в среде (до 50 %), а также утилизировать нефть при низких положительных температурах (+10 °С).

Известно, что ассоциации микроорганизмов способны гораздо эффективнее разлагать нефть, чем индивидуальные штаммы. Поэтому одной из задач данной работы являлось составление композиций углеводородокисляющих бактерий для деструкции нефти. Было установлено, что все исследованные варианты способны активно разлагать нефть при ее концентрации в среде 10 %.

Для более эффективного использования микроорганизмов-деструкторов необходимо понимание путей, по которым идет разложение нефти в природных условиях. С точки зрения микробной деструкции наибольший интерес представляют ароматические соединения. Исследования показали, что все изученные штаммы бактерий были способны разлагать ароматические углеводороды с образованием низкомолекулярных фенольных интермедиатов. Важно, что у штаммов 112 и 114, относящихся к виду *Acinetobacter guillouiae*, были зарегистрированы соединения, свидетельствующие о реализации различных путей деструкции ПАУ. Полученные результаты позволят лучше понять процессы разложения нефти микроорганизмами и дадут возможность точнее прогнозировать протекание этих процессов в почве.

Необходимым моментом до этапа промышленного использования штаммов-нефтедеструкторов в процессах очистки почв от нефтезагрязнений является получение данных о характере воздействия изучаемых штаммов на растения. Результаты нашей работы показали, что положительным влиянием на рост и развитие редьки масличной в условиях нефтяного загрязнения обладал штамм *R. erythropolis* (108). Обработка семян суспензией бактерий этого штамма повышала всхожесть, способствовала увеличению длины корня, высоты надземной части и массы. Одним из возможных механизмов снижения токсического действия нефти на растения является то, что этот штамм характеризуется активной продукцией биосурфактантов, способствующих разрушению нефтяной пленки на поверхности корня. В дополнение к указанному свойству в супернатанте данных бактерий выявлено значительное количество ауксинов. Таким образом, штамм 108 оказался способен не только разрушать нефть, но и способствовал лучшей выживаемости растений в условиях нефтезагрязнения, что позволяет отнести данный штамм к числу перспективных для целей фиторемедиации.

При внесении в почву нефти неизбежно изменяются ее биологические свойства. В ней меняется активность ферментов, количество

микроорганизмов и уровень дыхания. Внесение микроорганизмов-нефтедеструкторов сдвигает эти процессы в ту или иную сторону за счет более активного разложения нефти. Эти изменения приводят к увеличению фитотоксичности загрязненной почвы в процессе биоремедиации. В зависимости от характеристик внесенного микроорганизма возможно либо увеличение токсичности нефти на пике ее разрушения, либо снижение токсичности за счет выделения микроорганизмами защитных веществ (биосурфактантов).

Полученные данные позволяют рекомендовать аборигенные штаммы, выделенные из эндосферы и ризосферы растений для использования в биотехнологии утилизации нефтезагрязненной территории Иркутского региона.

ВЫВОДЫ

1. Из эндо- и ризосферы растений, произрастающих на нефтезагрязненной территории Заларинского района Иркутской области, выделено 60 культур углеводородокисляющих микроорганизмов. Путем скрининга отобрано 6 наиболее перспективных деструкторов нефти, которые за 2 мес культивирования в жидкой минеральной среде утилизировали около 50 % нефти.
2. Все исследованные штаммы бактерий разлагают ароматические компоненты нефти по наиболее распространенному среди микроорганизмов метаболическому пути, интермедиатом которого являлся пирокатехин, а штаммы *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus erythropolis* и *Acinetobacter guillouiae* 2 дополнительно используют альтернативный путь окисления, протекающий с образованием протокатеховой кислоты.
3. Все исследованные штаммы способны к эффективной деструкции нефти при высоких ее концентрациях в питательной среде. При исходной концентрации нефти 50 % наибольшую эффективность показал штамм *Acinetobacter guillouiae* 2. Убыль нефти составила 10 %.
4. Путем комбинирования наиболее активных штаммов подобраны ассоциации микроорганизмов, проявляющие высокую нефтеразрушающую активность при температуре +10 °С и 26 °С. Наибольшую эффективность показала ассоциация микроорганизмов *Acinetobacter guillouiae* 1+ *Acinetobacter guillouiae* 2. Убыль нефти составила до 32% при концентрации нефти в среде 10 %.
5. Установлено, что выделенный из ризосферы растений *Rhodococcus* sp. (штамм 108) наряду с высокой толерантностью к нефтепродуктам способен снижать негативное действие нефти на модельное растение (*Raphanus sativus* var. *oleiferus*) за счет синтеза биосурфактантов.
6. Наиболее перспективными с точки зрения восстановления нефтезагрязненных почв являются штаммы родов *Rhodococcus* (108), *Acinetobacter*2 (114), а также их ассоциация с *Acinetobacter*1 (112). В

присутствии этих микроорганизмов повышается эффективность разложения углеводородов нефти в загрязненной почве, увеличивается активность почвенных оксидоредуктаз (до 8 раз), усиливается интенсивность дыхания (до 74 %), снижается токсическое действие углеводородов нефти на растения (до 1,5 раз), восстанавливаются почвенные микробоценозы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев А.Ю. Не навреди / А.Ю. Алексеев // Промышленность и экология Севера. – 2011. – № 5-6. – С. 40- 47.
2. Аренс В.Ж. Очистка окружающей среды от углеводородных загрязнений / В.Ж. Аренс, А.З. Саушин, О.М. Гридин. – М.: Интербук, 1999. – 180 с.
3. 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. Известия СПбГТИ (ТУ). – 2014. – № 26. – С. 58-66.
4. Асабина Е.А. Исследование оптимальных условий культивирования бактерий рода *Pseudomonas*–продуцентов биологически активных веществ: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23. – Уфа, 2009. – 24 с.
5. Афонина А. Ю. Современное состояние земель, загрязненных нефтью при аварийных разливах на территории Иркутской области / А.Ю. Афонина, М.А. Пузырева, В.Ю. Оширова, С.Л. Гребенщиков - Белопухов // Агрономия. – 2015. – № 5. – С. 88-94.
6. Ахмадиев М. В. Оценка интенсивности дыхания нефтезагрязненных субстратов / М.В. Ахмадиев, Г.С. Арзамасова, М.И. Халецкая, А.А. Чугайнова // Прикладная экология. Урбанистика. – 2014. – № 4. – С. 165-176.
7. Барахнина В. Б. Сравнительный анализ биопрепаратов для ликвидации нефтяных загрязнений почвы и воды / В.Б. Барахнина // Экологический вестник России. – 2011. – № 10. – С. 14-17.
8. Белимов А.А. Взаимодействие ассоциативных бактерий и растений в зависимости от биотических и абиотических факторов: Дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.07. – Санкт-Петербург, 2008. – 46 с.
9. Благодатская Е.В. Активность и биомасса почвенных микроорганизмов в изменяющихся условиях окружающей среды / Е.В. Благодатская, М.В. Семенов, А.В. Якушев. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2016. – 243 с.

10. Ветрова А.А. Биодegradация углеводов нефти плазмидосодержащими микроорганизмами-деструкторами: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06. – Москва, 2010. – 23 с.
11. Ветрова А.А. Биодеструкция нефти отдельными штаммами и принципы составления микробных консорциумов для очистки окружающей среды от углеводов нефти / А.А. Ветрова, А.А. Иванова, А.Е. Филонов // Известия ТулГУ. Естеств. науки. – 2013. – № 1-2. – С. 241–257.
12. Ветрова А.А. Деструкция нефти бактериями, содержащие различные плазмиды биодegradации / А.А. Ветрова, А.А. Овчинникова, А.Е. Филонов, И.Ф. Пунтус, А.М. Боронин // Известия ТулГУ. Естеств. науки. – 2008. – № 2. – С. 186-193.
13. Винокуров В.А. Использование биодеструкторов для очистки территорий от нефти и нефтепродуктов: Обзор. / В.А. Винокуров, Р.Г. Василев // Вестник биотехнологии. – 2013. – Т. 9, № 1. – С. 51-57.
14. Водянова М.А. Анализ существующих микробиологических препаратов используемых для биодegradации нефти в почве / М.А. Водянова, Е.И. Хабарова, Л.Г. Донерьян // Горный информационный аналитический бюллетень (научно-технический журнал). – 2010. – № 10. – С. 253-258.
15. Возняковская Ю.М. Микрофлора растений и урожай. – Л.: Колос, 1969. – 240 с.
16. Войкова И.В. Микробиологическая очистка воды и почвы от нефти и нефтепродуктов / И.В. Войкова, Ю.Е. Конев // Интродукция микроорганизмов в окружающую среду: Материалы конф. Москва, ВИНТИ, 1994. – С. 12.
17. Воробьева Л.А. Химический анализ почв: / Л.А. Воробьева. – М.: Изд-во МГУ, 1998. – 272 с.
18. Габбасова И.М. Дegradация и рекультивация Южного Приуралья: Автореф. дис. ... доктора биол. наук: 03.00.27. – Москва, 2001. – 45 с.
19. Галимова Г.А. Состав, свойства, структура и фракции асфальтенов нефтяных дисперсных систем / Г.А. Галимова, Т.Н. Юсупова, Д.А.

Ибрагимова, И.Р. Якупов // Вестник Казанского технологического университета. – 2015. – Т. 18, № 20. – С. 60-64.

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

21. Гершенкоп А.Ш. Геоэкология: очистка сточных вод от нефтепродуктов методами, основанными на неорганических коагулянтах и аборигенных нефтеокисляющих бактериях / А.Ш. Гершенкоп, Г.А. Евдокимова, Н.П. Мозгова // Инженерная экология. – 2010. – № 6. – С. 54-58.

22. Григорьева Т.В. Состав микробного сообщества нефтешлама на основе анализа гена 16S рРНК / Т.В. Григорьева, А.В. Лайков, А.А. Ризванов, О.Н. Ильинская, Р.П. Наумова // Микробиология. – 2013. – Т. 82, № 5. – С. 635-639.

23. Гузев В.С., Левин С.В. Перспективы эколого-микробиологической экспертизы состояния почв при антропогенных воздействиях / В.С. Гузев, С.В. Левин // Почвоведение. – 1991. – № 9. – С. 50-61.

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

25. Денисова А.П. Влияние загрязнения дизельным топливом на устойчивость культур и биологическую активность выщелоченного чернозема / А.П. Денисова, Н.С. Архипова, А.Ф. Халилова, С.К. Зарипова, В.А. Бреус, И.П. Бреус // Агрохимия. – 2011. – № 2. – С. 41-50.

26. Другов Ю.С. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов / Ю.С. Другов, А.А. Родин. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2014. – 270 с.

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

28. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. – М.: Высшая школа, 1974. – 214 с.
29. Заушинцена А.В. Оценка экологического состояния почв, загрязненных нефтепродуктами / А.В. Заушинцена, А.С. Заушинцен, С В. Свиркова. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2013. – 80 с.
30. Ибатуллина И.З. Влияние биопрепаратов на микробиоту нефтезагрязненных засоленных лугово-каштановых почв / И.З. Ибатуллина, Т.А. Семенова, Ю.А. Виноградова и др. // Микология и фитопатология. – 2011. – Т. 45, № 6. – С. 504-511.
31. Иванов К. С. Микроэлементный состав нефтей Республики Татарстан (на примере Ромашкинского месторождения) / К.С. Иванов, К.Ш. Биглов, Ю.В. Ерохин // Вестник института геологии Коми научного центра Уральского отделения РАН. – 2013. – № 8. – С. 1-5.
32. Иванова А.А. Биодegradация нефти микробно-растительными ассоциациями / А.А. Иванова, А.А. Ветрова, А.Е. Филонов, А.М. Боронин // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51, № 2. – С. 191-197.
33. Ившина И.Б. Пропанокисляющие родококки: монография / И.Б. Ившина, Р.А. Пшеничнов, А.А. Оборин. – Свердловск: УНЦ АН СССР, 1987. – 125 с.
34. 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. – Уфа, 2009. – 16 с.
35. Казиахмедова И.А. Методы биоиндикации в оценке состояния нефтезагрязненных земель / И.А. Казиахмедова // Окружающая среда и устойчивое развитие регионов: новые методы и технологии исследований. – 2009. – Т. 4. – С. 106-108.
36. Карасева Т.В. Современные представления о формировании залежей нефти и газа / Т.В. Карасева // Вестник Пермского университета. – 2009. – № 11. – С. 6-14.

37. Киреева Н.А. Моделирование процессов биоремедиации нефтезагрязненных почв / Н.А. Киреева, В.В. Водопьянов, А.С. Григориади, Т.С. Онегова // Окружающая среда и устойчивое развитие регионов: новые методы и технологии исследований. – 2009. – Т. 3. – С. 40-43.
38. Киреева Н.А. Подбор растений для фиторемедиации почв, загрязненных нефтяными углеводородами / Н.А. Киреева, А.С. Григориади, В.В. Водопьянов, А.Р. Амирова // Известия Самарского научного центра РАН. – 2011. – Т. 13, № 5 (2). – С. 184-187.
39. Киреева Н.А. Эффективность применения биопрепаратов для восстановления плодородия техногенно-загрязненных почв / Н.А. Киреева, В.В. Водопьянов, А.С. Григориади, Е.И. Новоселова, Г.Г. Багаутдинова, А.Р. Гареева, Е.Ю. Лобастова // Известия Самарского научного центра РАН. – 2010. – Т. 12, № 1 (4). – С. 1023-1026.
40. Кириенко О.А. Влияние загрязнения почвы нефтепродуктами на состав микробного сообщества / О.А. Кириенко, Е.Л. Имранова // Вестник ТОГУ. – 2015. – № 3 (38). – С. 79-86.
41. Колесников С.И. Устойчивость биологических свойств почв Юга России к нефтяному загрязнению / С.И. Колесников, Д.К. Азнаурьян, К.Ш. Казеев, В.Ф. Вальков // Экология. – 2010. – № 5. – С. 357-364.
42. Конон А.Д. Использование нефтеокисляющих бактерий *Nocardia vaccinii* К-8 в природоохранных технологиях / А.Д. Конон, А.П. Софилканич, Н.А. Гриценко, С.А. Парфенюк, Т.П. Пирог // Биологический мониторинг природно-техногенных систем: Материалы Всеросс. конф.:– Киров: ООО «Лобань», 2011. – С. 125-129.
43. Копцик Г.Н. Современные подходы к ремедиации почв, загрязненных тяжелыми металлами / Г.Н. Копцик // Почвоведение. – 2014. – № 7. – С. 851–868.
44. 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 химический журнал. – 2013. – Т. 20, № 3. – С. 41-47.
45. Корнейкова М.В. Комплексы потенциально патогенных микроскопических грибов в антропогенно загрязненных почвах Кольского Севера / М.В. Корнейкова, Г.А. Евдокимова, Е.В. Лебедева // Микология и фитопатология. – 2012. – Т. 46, № 5. – С. 323-328.
46. Коршунова Т.Ю. Биотехнологический потенциал бактерий *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1. как основа полифункционального биопрепарата / Т.Ю. Коршунова, С.П. Четвериков, Э.Г. Валиуллин, О.Н. Логинов // Известия Вузов. Прикладная химия и Биотехнология. – 2016. – № 1 (16). – С. 93-97.
47. Коршунова Т.Ю. Микроорганизмы разлагающие нефтяные углеводороды при пониженной температуре / Т.Ю. Коршунова, А.А. Сабиров и др. // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2012. – № 3. – С. 76-82.
48. 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.
49. Кузнецов А.Е. Прикладная экобиотехнология: учебное пособие / А.Е. Кузнецов, Н.Б. Градова. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2012. – 629 с.
50. Лазарев А.П. Совершенствование технологии рекультивации нефтезагрязненных земель с применением бульдозера-смесителя: Автореф дис. ... канд. техн. наук: 06.01.02. – Саратов, 2014. – 22 с.
51. Леднев А.В. Изменение свойств дерново-подзолистых суглинистых почв под действием загрязнения продуктами нефтедобычи и приемы их рекультивации: Автореф. дис. ... доктора с-х. наук: 06.01.03. – Ижевск, 2008. – 43 с.
52. Ленева Н.А. Деградация фенантрена и антрацена бактериями рода *Rhodococcus* / Н.А. Ленева, М.П. Коломыцева, Б.П. Баскунов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 2. – С. 188-194.

53. Леонов К.А. Изучение процесса деструкции нефраса УОМ / К.А. Леонов, А.П. Асташкина, Т.А. Мостовская // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 8. – С. 650-654.
54. Логинова Т.Т. Использование штаммов рода *Acinetobacter* для биоремедиации нефтезагрязненных почв на территории Воронежской области / Т.Т. Логинова, Е.В. Данг, М.Ю. Белоусова, О.О. Грабович // Вестник ВГУ. – 2011. – № 2. – С.127-133.
55. Маркова Ю.А. Полигостальность условно-патогенных энтеробактерий на модели их взаимодействия с растениями: Автореф. дис. ... доктора биол. наук: 03.02.03. – Иркутск, 2013. – 42 с.
56. Марченко М.Ю. Биоремедиация нефтезагрязненных почв / М.Ю. Марченко // Башкирский химический журнал. – 2011. – Т. 18, № 4. – С. 191-197.
57. Маслова С.П. Реакция корневищного злака *Phalaroides arundinacea* на загрязнение почвы нефтью / С.П. Маслова, Г.Н. Табаленкова // Агрохимия. – 2010. – № 8. – С. 66-71.
58. Матвеева Т.В., Богомаз Д.И., Лутова Л.А. Малый практикум по генной инженерии / Т.В. Матвеева, Д.И. Богомаз, Л.А. Лутова // СПб: Реноме, 2011. – 52 с.
59. Методические указания по дисциплине «Химия нефти и газа». – М.: Изд. РГУ нефти и газа им. И.М. Губкина, 2002. – 40 с.
60. Методы определения фитогормонов и фенолов в семенах / под ред. М. Г. Николаевой. – Л.: Наука, 1979. – 78 с.
61. Методы почвенной микробиологии и биохимии: учебное пособие /под ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 304 с.
62. Миертус С. Справочник. Технологии восстановления почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами / С. Миертус, Н.Ю. Гречищева, С.В. Мещеряков, Н.Г. Рыбальский, А.Р. Барсов – М.: РЭФИА, НИА-Природа, 2001. – 185 с.

63. Муратова А.Ю. Растительно-микробные ассоциации в условиях углеводородного загрязнения: Автореф. дис. ... доктора биол. наук: 03.00.07, 03.01.06. – Саратов, 2013. – 47 с.
64. Мязин В.А. Разработка способов повышения эффективности биоремедиации почв кольского севера при загрязнении нефтепродуктами (в условиях модельного эксперимента): Дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08. – Апатиты, 2014. – 159 с.
65. 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.
66. Назина Т.Н. Образование нефтewытесняющих соединений микроорганизмами из нефтяного месторождения Дацин (КНР) / Т.Н. Назина, Д.Ш. Соколова, А.А. Григорьян, Я.Ф. Сюэ, С.С. Беляев, М.В. Иванов // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 2. – С. 206-211.
67. Незнамова Е.Г. Основы коррекции экологических ситуаций в трех средах / Е.Г. Незнамова // Томский государственный университет систем управления и радиоэлектроники, 2007. – 154 с.
68. Некрасова А.А. Воздействие нефти и нефтепродуктов на окружающую среду / А.А. Некрасова, Д.М. Привалов, О.С. Попова, Н.М. Привалова, М.В. Двадненко // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2017. – № 125. – С. 25.
69. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.// Под. ред. А.И. Нетрусова. – М.: Изд. Центр. «Академия», 2005. – 608 с.
70. Нефтегазовая энциклопедия. Издание в 3 т. под. общ. ред. Ю.В. Вадецкого. – М.: Московское отд. «Нефть и газ», 2003. – 380 с.

71. Нефть: добыча и переработка [Электронный ресурс] / Stati-raznoe/neft-dobycha-i-pererabotka-246. – Режим доступа: <http://sait-sovetov.net/stati-raznoe/neft-dobycha-i-pererabotka-246.php> – 20.05.2015
72. Новоселова Е.И. Экологические аспекты трансформации ферментного пула почвы при нефтяном загрязнении и рекультивации: Автореф. дис. ... доктора биол. наук: 03.00.27, 03.00.16. – Воронеж, 2008. – 30 с.
73. Овсянникова В.С. Биодеструкция углеводов высоковязкой нефти почвенными микроорганизмами / В.С. Овсянникова, Д.А. Филатов, Л.К. Алтунина, Л.И. Сваровская // Химия в интересах устойчивого развития. – 2014. – Т. 22, № 5. – С. 489- 495.
74. Панов А.В. Влияние загрязнения почвы на состав микробного сообщества // А.В. Панов, Т.З. Есикова, С.Л. Соколов, И.А. Кошелева, А.М. Боронин // Микробиология. – 2013. – Т. 82, № 2. – С. 239-246.
75. Писарчук А.Д. Эколого-микробиологические аспекты биоремедиации нефтезагрязненных экосистем и угольных карьеров: Дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08. – Томск, 2014. – 152 с.
76. Плешакова Е. В. Изменение биологической активности загрязненной углеводородами почвы / Е. В. Плешакова, А. Ю. Муратова, О. В. Турковская // Поволжский экологический журнал. – 2011. – № 4. – С. 482-488.
77. Плешакова Е.В. Сравнение эффективности интродукции нефтеокисляющего штамма *Dietzia maris* и стимуляции естественных микробных сообществ для ремедиации загрязненной почвы / Е.В. Плешакова, Е.В. Дубровская, О.В. Турковская // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44, № 4. – С. 430-437.
78. Плотникова И.Н. Фракционный состав нефти и методы его изучения / И.Н. Плотникова: учебно-методическое пособие. – Казань: Казанский университет, 2012. – 30 с.
79. Подавалов Ю.А. Экология нефтегазового производства / Ю.А. Подавалов. – М.: Инфра-Инженерия, 2010. – 416 с.

80. Полянскова Е.А. Экологическая оценка серых лесных и черноземных почв различной степени загрязнения нефтью: Автореф. ... канд. биол. наук: 03.02.08. – Пенза. – 22 с.
81. Поташников Ю.М. Утилизация отходов и потребления / Ю.М. Поташников. – Тверь: Изд-во ТГТУ, 2004. – 107 с.
82. Пунтус И.Ф. Дegrаdация 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.
83. Пунтус И.Ф. Роль минеральных форфорных соединений в процессе биодegrаdации нафталина бактериями *Pseudomonas putida* // И.Ф. Пунтус, Л.П. Рязанова, А.Н. Звонарев, Т.В. Фунтикова, Т.В. Кулаковская // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т.51, № 2. – С. 198-205.
84. Пуртова Л.Н., Костенков Н.М. Эмиссия CO₂ из почв природных ландшафтов юга Приморья. Вестник КрасГАУ. – 2013. – № 10. – С. 64-68.
85. 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 // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, № 3. – С. 298-305.
86. 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.
87. Руденко Е. Ю. Экологические основы биологической рекультивации нефтезагрязненных почв / Е.Ю. Руденко // Самар. гос. техн. ун-т. – Самара: СамГТУ, 2012. – 166 с.
88. Рябов В.Д. Химия нефти и газа: учебное пособие / В.Д. Рябов. – М.: ИД Форум, 2009. – 336 с.

89. Рябцева Н.Д. Способность культуры *Candida* к биодegradации нефтепродуктов / Н.Д. Рябцева, В.С. Никитина, А.А. Кадилов, М.И. Абдуллин // Вестник Башкирского университета. – 2015. – Т. 20, № 4. – С. 1227-1229.
90. Сазыкин И.С. Утилизация углеводов, 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.
91. 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, № 1. – С. 41-49.
92. 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.
93. Скрябин Г.К. Использование микроорганизмов в органическом синтезе / Г.К. Скрябин, Л.А. Головлева. – М.: Наука, 1976. – 332 с.
94. Сулейманов Р.Р. Влияние нефтяного загрязнения на динамику биохимических процессов чернозема обыкновенного / Р.Р. Сулейманов, Т.С. Шорина // Известия Самарского научного центра РАН. – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 240-243.
95. Сулейманов Р.Р. Ферментативная активность и агрохимические свойства луговоаллювиальной почвы в условиях нефтяного загрязнения / Р.Р. Сулейманов, Т.А. Абдрахманов, З.А. Жаббаров, Л.Т. Турсунов // Известия Самарского научного центра РАН. – 2008. – Т. 10, № 2. – С. 294-298.
96. Сухова И.В. Современное состояние органического вещества верховых торфяников Западной Сибири в условиях нефтяного загрязнения / И.В. Сухова, Л.К. Садовникова, С.Я. Трофимов // Сохраним планету Земля: сборник докладов международного экологического форума. – СПб: Центральный музей почвоведения им. В.В. Докучаева, 2004. – С. 188-191.

97. Тарабукина Н.П. Экологическая оценка и биоремедиация нефтезагрязненных мерзлотных почв Якутии: монография / Н.П. Тарабукина, Д.Д. Саввинов, М.М. Неустроев, А.М. Степанова, М.П. Неустроев, Н.Н. Сазонов, С.И. Парникова; Якут. науч.-исслед. ин-т сел. хоз-ва. – Новосибирск: Изд. АНС «СибАК», 2017. – 136 с.
98. Терехова В.А. Биотестирование почв. Подходы и проблемы // Почвоведение. – 2011. – № 2. – С. 190-198.
99. Тимергазина И.Ф. К проблеме биологического окисления нефти и нефтепродуктов углеводородокисляющими микроорганизмами / И.Ф. Тимергазина, Л.С. Переходова // Нефтегазовая геология. Теория и практика. – 2012. – Т. 7, № 1.– С. 28.
100. Тимурзиев А.И. Современное состояние теории происхождения и практики поисков нефти: тезисы к созданию научной теории прогнозирования и поисков глубинной нефти / А.И. Тимурзиев // Глубинная нефть. – 2013. – Т. 1, № 1. – С. 18-44.
101. Требин Г.Ф. Чарыгин Н.В., Обухова Т.М. Нефти месторождений Советского союза. – М: Недра, 1980. – 583 с.
102. Трошкова Г.П. Экологическая биотехнология : учеб.пособие / Г.П. Трошкова, Е.К. Емельянова, Н.О. Карабинцева. – Новосибирск: Сибмедиздат НГМУ, 2011. – 144 с.
103. Уваров Г.И., Голеусов П.В. Практикум по почвоведению с основами бонитировки почв. – Белгород: Изд-во БелГУ, 2004. – 85 с.
104. Федоренко В.Н. Выделение и оценка биотехнологического потенциала микроорганизмов для утилизации нефтяных загрязнений северных морей: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03, 03.01.06. – Москва, 2016. – 28 с.
105. 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.

106. 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.
107. Хабибуллина Ф.М. Трансформация сообщества микромицетов в торфяно-глеевых почвах Крайнего Севера при нефтяном загрязнении / Ф.М. Хабибуллина, И.З. Ибатуллина // Теоретическая и прикладная экология. – 2011. – № 3. – С. 76-86.
108. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. – М.: Наука, 1990. – 189 с.
109. Хазиев Ф.Х. Экология почв Башкортостана. – Уфа: АН РБ. Гилем, 2012. – 36 с.
110. Хоменков В.Г. Организация метаболических путей и молекулярно-генетические механизмы биodeградации ксенобиотиков у микроорганизмов (Обзор) / В.Г. Хоменков, А.Б. Шевелёв, В.Г. Жуков, Н.А. Загустина, А.М. Безбородов, В.О. Попов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44, № 2. – С. 133-152.
111. Чеботарь В.К. Эндofитные бактерии в микробных препаратах, улучшающих развитие растений (Обзор) / В. К. Чеботарь, Н.В. Мальфанова, А.В. Щербаков, Г.А. Ахтемова, А.Ю. Борисов, Б.Люгтенберг, И.А. Тихонович // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51, № 3. – С. 283–289.
112. Чернявская М.И. Экологическая микробиология: учеб. метод. пособие / М.И. Чернявская, А. В. Сидоренко, С. Г. Голенченко, В. В. Лысак, А. С. Самсонова. – Минск: БГУ, 2016. – 63 с.
113. Чумаков М.И. Новый ассоциативный diaзотроф *Agrobacterium radiobacter* из гистосферы пшеницы / М.И. Чумаков, В.В. Горбань, Л.Е. Ковлер, Г.К. Соловова, Ю.В. Кривопапов, А.Ю. Васильев, В.Д. Фролова, Е.М. Муронец, С.В. Каменева // Микробиология. – 1992. – Т. 61, № 1. – С. 92-102.

114. Шамраев А.В. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды / А.В. Шамраев, Т.С. Шорина // Вестник ОГУ. – 2009. – № 6. – С. 642–645.
115. Шуткова С.А. Исследование надмолекулярной структуры наночастиц нефтяных асфальтенов / С.А. Шуткова // Башкирский химический журнал. – 2012. – Т. 19, № 4. – С. 220-226.
116. Щемелинина Т.Н. Липазная активность в качестве диагностического критерия оценки нефтезагрязнения почв / Т.Н. Щемелинина // Вестник Института биологии. – 2011. – № 10-11. – С. 40-41.
117. 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.
118. Adetiton D.O. Hydrocarbon-degrading capability of bacteria isolated from a Maize-Planted, Kerosene-contaminated Ilorin Alfisol / D.O. Adetiton, A.B. Olayemi, O.M. Kolawole // Biokemistri. – 2014. – V. 26, № 1. – P. 13-18.
119. Ahmad F. Enhanced remediation of chlorpyrifos from soil using ryegrass (*Lolium multiflorum*) and chlorpyrifos-degrading bacterium *Bacillus pumilus* C2A1 / F.Ahmad, S.Iqbal, S.Anwar, M.Afzal. E.Islam, T.Mustafa, K.J. Hazard // Journal of hazardous materials. – 2012. – V. 237, № 1. – P. 110-115.
120. Aken V.B. Biodegradation of nitro-substituted explosives 2, 4, 6-trinitrotoluene, hexahydro- 1, 3, 5-trinitro-1, 3, 5 triazine, an octahydro-1, 3, 5, 7-tetranitro-1, 3, 5- tetrazocine by a phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. associated with poplar tissues (*Populus deltoides* x *nigra* DN34) / V.B. Aken, J.M. Yoon, J.L. Schnoor // Applied and environmental microbiology. – 2004. – V. 70, № 1. – P. 508-517.
121. Al-Baldawi I.A. Phytodegradation of total petroleum hydrocarbon (TPH) in diesel contaminated water using *Scirpus grossus* / I.A. Al-Baldawi, S.R. Sheikh, N. Abdullah, F. Anuar, I. Mushrifah // Ecological Engineering. – 2015. – V. 74. – P. 463–473.

122. Al-Mailem D. Culture dependent and culture-independent analysis of hydrocarbonoclastic microorganisms indigenous to hypersaline environments in Kuwait // D. Al-Mailem, M. Eliyas, M. Khanafer, S. Radwan // *Microbial ecology*. – 2014. – V. 67, № 4. – P.857–865.
123. Al-Majed A.A. A sustainable approach to controlling oil spills / A.A. Al-Majed, A.R. Adebayo, M.E. Hossain // *Journal of Environmental Management*. – 2012. – V. 113. – P. 213-227.
124. 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 // *Journal of Genetic and Environmental Resources Conservation*. – 2013. – V. 1, № 2. – P. 106–110.
125. 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 // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. – 2016. – V. 91, № 6. – P. 1577–1584.
126. Baboshin M. A. Aerobic Bacterial degradation of Polycyclic Aromatic hydrocarbons and its kinetic aspects / M.A. Baboshin and L.A. Golovleva // *Microbiology*. – 2012. – V. 81, № 6. – P. 639-650.
127. 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 // *Science of the total environment*. – 2011. – V. 409, № 19. – P. 4087–4093.
128. Binazadeh M. Fast biodegradation of long chain n-alkanes and crude oil at high concentrations with *Rhodococcus* sp. Moj-3449 / M. Binazadeh, I.A. Karimi, Z. Li // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2009. – V. 45, № 3. – P. 195–202.
129. Borzenkov I.A. The properties of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from the oil fields of Tatarstan, Western Siberia, and Vietnam / I.A. Borzenkov, E.I. Milekhina, M.T. Gotoeva, E.P. Rozanova, S.S. Belyaev // *Microbiology*. – 2006. – V. 75, № 1. – P. 66–72.

130. Chandra S. Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon / S. Chandra, R. Sharma, K. Singh, A. Sharma // *Annals of microbiology*. – 2013. – V. 63, № 2. – P. 417–431.
131. 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. 9, № 11. – P. 1620 – 1626.
132. Compant S. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain / S. Compant, B. Reiter, A. Sessitsch, J. Nowak, C. Clément, E. A. Barka // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2005. – V. 71, № 4. – P. 1685-1693.
133. Cooper D.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species / D.G. Cooper, B.G. Goldenberg // *Applied and Environmental microbiology*. – 1987. – V. 53, № 2. – P. 224-229.
134. 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.
135. Das N. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview / N. Das, P. Chandran // *Biotechnology research international*. – 2011. – V. 2011. – P. 1-13.
136. Dave D. Remediation technologies for marine oil spills: a critical review and comparative analysis / D. Dave, A. E. Ghaly // *American Journal of Environmental Sciences*. – 2011. – V. 7, № 5. – P. 423.
137. Denga 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. Denga, J. Lib, F. R. Liangd, M. Yid, X. M. Xua, J.P. Yuand, J. Pengd, C.F. Wud, J.H. Wanga // *Marine Pollution Bulletin*. – 2014. – V. 83, № 1. – P. 79–86.

138. 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, № 11. – P. 141-146.
139. Erdogan E.E. Bioremediation of crude oil polluted soils / E. E. Erdogan, A. Karaca // *Asian Journal of Biotechnology.* – 2011. – № 3. – P. 206–213.
140. Evdokimova G.A. Complexes of potentially pathogenic microscopic fungi in anthropogenic polluted soils / G.A. Evdokimova, M.V. Korneykova, E.V. Lebedeva // *Environmental Science and Health. Part A.* – 2013. – V. 48, № 7. – P. 746-752.
141. Feller G. Polar microorganism and biotechnology / G. Feller, R. Margesin // *Polar microbiology: Life in a Deep freeze.* American Society of Microbiology. – 2012. – P. 166-180.
142. 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 // *International Biodeterioration & Biodegradation.* – 2014. – V. 86. – P. 300–308.
143. Fuentes S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications / S. Fuentes, V. Mendez, P. Aguila, M. Seeger // *Applied microbiology and biotechnology.* – 2014. – V. 98, № 11. – P. 4781-4794.
144. 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 // *Applied biochemistry and biotechnology.* – 2013. – V. 170, № 2 – P. 329–339.
145. Grund E. Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4 / E. Grund, B. Denecke, R. Eichenlaub // *Applied and Environmental Microbiology.* – 1992. – V. 58, № 6. – P. 1874-1877.
146. 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 Biology and Biochemistry*. – 2007. – V. 39, № 8. – P. 1926–1935.
147. Harayama S. Petroleum biodegradation in marine environments / S. Harayama, H. Kishira, Y. Kasai, K. Shutsubo // *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. – 1999. – V. 1, № 1. – P. 63-70.
148. Ilori M.O. Ultrastructure of Two Oil-Degrading Bacteria Isolated from the Tropical Soil Environment / M.O. Ilori, D. Amund, G.K. Robinson // *Folia Microbiology*. – 2000. – V. 45, № 3. – P. 259 - 262.
149. 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, № 5. – P. 115-120.
150. Joutey N.T. Biodegradation: involved microorganisms and genetically engineered microorganisms / N.T. Joutey, W. Bahafid, H. Sayel, N. Ghachtouli // *Biodegradation-life of science*. – 2013. – V. 1. – P. 289–320.
151. Kaczorek E. Biodegradation of alkyl derivatives of aromatic hydrocarbons and cell surface properties of a strain of *Pseudomonas stutzeri* / E. Kaczorek, K. Sałek, U. Guzik, T. Jesionowski, Z. Cybulski // *Chemosphere*. – 2013. – V. 90, № 2. – P. 471–478.
152. Kauppi S. Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: Comparison of biostimulation and bioaugmentation / S. Kauppi, A. Sinkkonen, M. Romantschuk // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2011. – V. 65, № 2. – P. 359–368.
153. 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.
154. Khan Z. Endophyte-assisted phytoremediation / Z. Khan, S. Doty // *Plant Biology*. – 2011. – V. 12. – P. 97-105.
155. Kireeva N.A. Biodegradation of petroleum in the soil cultures hydrocarbons oxidizing microorganisms / N.A. Kireeva // *Biotechnology*. – 1996. – № 1. – P. 51-54.

156. Krishnan S. o-Phthalic acid, a dead-end product in one of the two. pathways of phenanthrene degradation in *Pseudomonas* sp. / Y. Prabhu, P.S. Phale // *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. – 2004. – V. 41, № 5. – P. 227–232.
157. Kumar A. Review on Bioremediation of Polluted Environment / A. Kumar B.S. Bisht, V. D. Joshi // *International journal of environmental sciences* – 2011. – V. 1, № 6. – P. 1079-1093.
158. 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 Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2007. – V. 23, № 2. – P. 211-220.
159. Kuznetsov V.D. *Streptomyces albiacialis* 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.
160. Lade A. Biodegradation and detoxification of textile azo dyes by bacterial consortium under sequential microaerophilic / aerobic processes / A. Lade, D. Kadam, S. Paul // *EXCLI journal*. – 2015. – V. 14. – P. 158–174.
161. Liang Y.T. Spatial variations of hydrocarbon contamination and soil properties in oil exploring fields across China / Y.T. Liang, X.Zhang, J.Wang, J. Li // *Journal of hazardous materials*. – 2012. – V. 241. – P. 371–378.
162. 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 // *Ecotoxicology and environmental safety*. – 2011. – V. 74, № 7. – P. 1967–1972.
163. Lodewyckx C. Endophytic bacteria and their potential applications / C. Lodewyckx, J. Vangronsveld, F. Porteuou, E.R. Moore, S. Taghavi, M. Mezgeay, D. V. Lelie // *Critical Reviews in Plant Sciences*. – 2002. – V. 21, № 6. – P. 583-606.
164. Macaulay B.M. Understanding the behaviour of oil-degrading microorganisms to enhance the microbial remediation of spilled petroleum. / B.M.

- Macaulay // *Applied Ecology and Environmental Research*. – 2015. – V. 13, № 1. – P. 247–262.
165. Malik Z.A. Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium / Z.A. Malik, S. Ahmed // *African Journal of Biotechnology*. – 2012. – V. 11, № 3. – P. 650–658.
166. Mandri T. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa / T. Mandri, J. Lin // *African journal of Biotechnology*. – 2007. – V. 6, № 1. – P. 023–026.
167. Margesin R. Low temperature biodegradation of petroleum hydrocarbons (n-alkanes, phenol, anthracene, pyrene) by four actinobacterial strains / R. Margesin, G. Moertelmaier, J. Mair // *International Biodeterioration and Biodegradation*. – 2013. – V. 84. – P. 185-191.
168. Mikolasch A. Enrichment of aliphatic, alicyclic and aromatic acids by oil-degrading bacteria isolated from the rhizosphere of plants growing in oil-contaminated soil from Kazakhstan / A. Mikolasch, A. Omirbekova, P. Schumann, A. Reinhard, H. Sheikhany, R. Berzhanova, T. Mukasheva, F. Schauer // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2015. – V. 99, № 9. – P. 4071-4084.
169. Mnif S. Isolation and characterization of *Halomonas* sp. strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hypersaline conditions / S. Mnif, M. Chamkha, S.J. Sayadi // *Journal of Applied Microbiology*. – 2009. – V. 107, № 3. – P. 785–794.
170. Mnif S. Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oil field-selected bacteria / S. Mnif, M. Chamkha, M. Labat, S.J. Sayadi // *Journal of Applied Microbiology*. – 2011. – V. 111, № 3. – P. 525-536.
171. Moreira I.T. Phytoremediation using *Rhizophora mangle* L. in mangrove sediments contaminated by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH's) / I.T. Moreira, O.M.C. Oliveira, J.A. Triguís, A.M.P. dos Santos, A.F.S. Queiroz, C.M. Martins, C.S. Silva, R.S. Jesus // *Microchemical Journal*. – 2011. – V. 99, № 2. – P. 376–382.

172. Mukasheva T.D. Biodiversity of plants rhizosphere and rhizoplane bacteria in the presence of petroleum hydrocarbons / T.D. Mukasheva, A.A. Omirbekova, R. Sydykbekova, L. Ignatova, R. Berzhanova // World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Bioengineering and Life Sciences. – 2014. – V. 1, № 6. – P. 1647-1648.
173. Ndimele P.E. A review on the phytoremediation of petroleum hydrocarbon / P.E. Ndimele // Pakistan Journal of Biological Sciences. – 2010. – V. 13, № 15. – P. 715.
174. Nkwelang G. Studies on the diversity, abundance and succession of hydrocarbon utilizing micro organisms in tropical soil polluted with oily sludge / G Nkwelang, H.F.L. Kanga, G.E. Nkeng and S.P. Antai // African Journal of Biotechnology. – 2008. – V. 7, № 8. – P. 1075-1080.
175. Olajire A.A. Aerobic Degradation of Petroleum Components by Microbial Consortia / A.A. Olajire, J.P. Essien // Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology. – 2014. – V. 5, № 5. – P. 1.
176. Oliveira V. Effects of the Inoculant Strain *Pseudomonas* sp. SPN31 nah+ and of 2-Methylphthalene Contamination on the Rhizosphere and Endosphere Bacterial Communities of *Halimione portulacoides* / V. Oliveira, N.C. Gomes, M. Santos, A. Almeida, A.I. Lillebø, J. Ezequiel // Current microbiology. – 2017. – V. 74, № 5. – P. 575-583.
177. Oliveira V. Hydrocarbon contamination and plant species determine the phylogenetic and functional diversity of endophytic degrading bacteria / V. Oliveira, C. Newton, M. Gomes, A. Almeida // Molecular Ecology. – 2014. – V. 23, № 6. – P. 1392-1404.
178. Patel R.N. Relationships among enzymes of the P-Ketoadipate Pathway / R.B. Meagher, L.N. Ornston // Journal of Biological Chemistry. – 1974. – V. 249, № 23. – P. 7410–7419.
179. Phulia V. Freshwater ecosystem and xenobiotics / A. Jamwal, N. Saxena, N.K. Chadha, A.P. Muralidhar, A.K. Prusty // Technologies in aquatic remediation. – 2002. – V. 1. – P. 65-91.

180. Pimmata P. Comparative bioremediation of carbofuran contaminated soil by natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation / P.Pimmata, A. Reungsang, P. Plangklang // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2013. – V. 85. – P. 196–204.
181. Rajasekar A. Role of Hydrocarbon Degrading Bacteria *Serratia marcescens* ACE2 and *Bacillus cereus* ACE 4 on Corrosion of Carbon Steel API 5LX / A. Rajasekar, R. Balasubramanian, J.V.M. Kuma // *Industrial and Engineering Chemistry Research*. – 2011. – V. 50, № 17. – P. 10041–10046.
182. 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 // *International journal of environmental science and technology*. – 2016. – V. 13, № 12. – P. 2863-2874.
183. Ribeiro H. Influence of natural rhizosediments characteristics on hydrocarbons degradation potential of microorganisms associated to *Juncus maritimus* roots / H. Ribeiro, C.M.R. Almeida, A.P. Mucha, C. Teixeira, A.A Bordalo // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2013. – V. 84. – P. 86–96.
184. 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 // *Applied and environmental microbiology*. – 2015. – V. 81, № 11. – P. 3775–3781.
185. Rojo F. Degradation of alkanes by bacteria / F. Rojo // *Environmental microbiology*. – 2009. – V. 11, № 10. – P. 2477-2490.
186. 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. Boruah, D. Saikia, N. Bora // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2014. – V. 94, № 2. – P. 79–89.
187. Ryan R. Bacterial endophytes: recent developments and applications / R. Ryan, K. Germaine, A. Franks, D. Ryan, D. Dowling // *FEMS microbiology letters*. – 2008. – V. 278, №1. – P. 1-9.

188. Seeger E.M. Bioremediation of benzene-, MTBE- and ammonia-contaminated groundwater with pilot-scale constructed wetlands // E.M. Seeger, P. Kusch, H. Fazekas, P. Grathwohl, M. Kaestner // Environmental pollution. – 2011. – V. 159, № 12. – P. 3769–3776.
189. 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 // International Journal of Environmental Science and Technology. – 2014. – V. 11, № 2. – P. 367–376.
190. Siciliano S.D. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination / S.D Siciliano, N. Fortin, A. Mihoc, G. Wisse, S. Labelle, D. Beaumier, P. Schwab // Applied and environmental microbiology. – 2001. – V. 67, № 6. – P. 2469-2475.
191. Sikkema J. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons / J. Sikkema, J. Bont, B. Poolman // Microbiological reviews. – 1995. – V. 59, № 2. – P. 201–222.
192. 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 // Journal of hazardous materials. – 2013. – V. 262. – P. 158–167.
193. Singh H. Mycoremediation: Fungal Bioremediation / H. Singh // Wiley-Interscience, 2006. – 660 p.
194. Smulek A. *Rahnella* sp. strain EK12: Cell surface properties and diesel oil biodegradation after long-term contact with natural surfactants and diesel oil / A. Smulek, U. Zdarta, B. Guzik, Dudzińska-Bajorek // Microbiological research. – 2015. – V. 176. – P. 38–47.
195. 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, F. Rahim, M. R. Taha, N. Hambali, M. R. Razali, A. Khalid // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2014. – V. 90. – P. 115–122.

196. Sutton N.B. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure // N.B. Sutton, F. Maphosa, J.A. Morillo et al. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2013. – V. 79, № 2. – P. 619–630.
197. 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 // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2013. – V. 84. – P. 150–154.
198. 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.
199. Thapa B. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil / B. Thapa, A.K.C. Kumar, A. Ghimire // *Kathmandu university Journal of science, Engineering and technology*. – 2012. – V. 8, № 1. – P. 164-170.
200. Throne-Holst M. Identification of novel genes involved in long-chain n-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. strain DSM 17874 / M. Throne-Holst, A. Wentzel, T.E. Ellingsen, H.K. Kotlar, S.B. Zotchev // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2007. – V. 73, № 10. – P. 3327-3332.
201. Tomei M.C. Ex situ bioremediation of contaminated soils: An overview of conventional and innovative technologies / M.C. Tomei, A.J. Daugulis // *Critical reviews in environmental science and technology*. – 2013. – V. 43, № 20. – P. 2107–2139.
202. Walls W.D. Petroleum refining industry in China Energy Policy / W.D. Walls // *Energy Policy*. – 2010. – V. 38, № 5. – P. 2110–2115.
203. Wang Y. Understanding plant-microbe interactions for phytoremediation of petroleum- polluted soil / Y. Wang, J. Yu, M. Xiao // *PloS one*. – 2011. – V. 6, № 3. – P. 1-8.
204. Wezel A. P. Narcosis due to environmental pollutants in aquatic organisms: Residue-based toxicity, mechanisms, and membrane burdens / A.P. Wezel, A.

- Opperhuizen // *Critical Reviews in Toxicology*. – 1995. – V. 25, № 3. – P. 255–279.
205. Willumsen P.A. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers / P.A. Willumsen, U. Karlson // *Biodegradation*. – 1996. – V. 7, № 5. – P. 415-423.
206. Wojcieszńska D. Bacterial degradation of naproxen - Undisclosed pollutant in the environment / D. Wojcieszńska, K. Domaradzka Hupert-Kocurek, U. Guzik // *Journal of environmental management*. – 2014. – V. 145. – P. 157–161.
207. Wojcieszńska K. Hupert-Kocurek Factors affecting activity of catechol 2,3-dioxygenase from 2-chlorophenol-degrading *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 / K. Wojcieszńska Hupert-Kocurek, U. Guzik // *Biocatalysis and Biotransformation*. – 2013. – V. 31, № 3. – P. 141–147.
208. Wu Y. Mechanisms of removing pollutants from aqueous solutions by microorganisms and their aggregates: A review. / Y. Wu, T. Li and L. Yang // *Bioresource Technology*. – 2012. – V. 107. – P. 10–18.
209. Xenia M. Microorganisms Metabolism during Bioremediation of Oil Contaminated Soils / M. Xenia, R. Refugio // *J. of Bioremediation & Biodegradation*. – 2016. – V. 7, № 340. – P. 1-6.
210. Xue Y. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments / Y. Xu, M. Lu // *Journal of hazardous materials*. – 2010. – V. 183, № 1. – P. 395–401.
211. Yadav A.K. Isolation and characterization of biosurfactant producing *Bacillus* sp. from diesel fuel-contaminated site / A.K. Yadav // *Microbiology*. – 2016. – V. 85, № 1. – P. 56–62.
212. Yousaf S. Hydrocarbon degradation, plant colonization and gene expression of alkane degradation genes by endophytic *Enterobacter ludwigii* strains / S. Yousaf, M. Afzal, T.G. Reichenauer, C.L. Brady // *Environmental pollution*. – 2011. – V. 159, № 10. – P. 2675-2683.
213. Yu Y. Preparation of petroleum-degrading bacterial agent and its application in remediation of contaminated soil in Shengli Oil Field China / Y. Yu, W. Zhang,

G. H., Y.C. Chen Gao, J.N. Wang // Environmental Science and Pollution Research. – 2014. – V. 21, № 13. – P. 7929-7937.

214. Zachow C. Sugar beet-associated bacterial and fungal communities show a high indigenous antagonistic potential against plant pathogens / C. Zachow, R. Tilcher, G. Berg // Microbial ecology. – 2008. – V. 55, № 1. – P. 119-129.

215. Zaki M. S. Bioremediation of contaminants / M.S. Zaki, O.M. Fawzi // J. Life Sci. – V. 10, № 1. – P. 3329–3332.

216. Zvyagintseva I.S. Effect of the medium salinity on oil degradation by Nocardioform bacteria / Zvyagintseva I.S., Poglasova M.N., Gotoeva M.T., Belyaev S.S. // Microbiology. – 2001. – V. 70, № 6. – P. 652–656.