

На правах рукописи



Плешакова Екатерина Владимировна

ЭКОЛОГО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ
МИКРОБНОЙ РЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЁННЫХ ПОЧВ

03.02.08 – экология (биологические науки)

03.02.03 – микробиология

Автореферат диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Саратов – 2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (ИБФРМ РАН) и Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
Турковская Ольга Викторовна

Официальные оппоненты: член-корр. РАН, доктор биологических наук, профессор
Розенберг Геннадий Самуилович
доктор биологических наук, профессор
Анищенко Татьяна Григорьевна
доктор биологических наук, профессор
Карпунина Лидия Владимировна

Ведущая организация: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Башкирский государственный университет»

Защита состоится 29 декабря 2010 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.243.13 при Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83, E-mail: biosovet@sgu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич ГОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Автореферат разослан «___» ноября 2010 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета



С.А. Невский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследований. В настоящее время в результате антропогенной деятельности происходит широкомасштабное загрязнение окружающей среды токсичными веществами. Нефть и нефтепродукты признаны основными загрязнителями окружающей среды (Eurosoil 2008). Потери нефти и нефтепродуктов в России при добыче, транспортировке, переработке и хранении по официальным данным оцениваются в 8-9 млн т в год. Особую нагрузку при этом испытывает почва, что проявляется в ухудшении её морфологических и физико-химических свойств, угнетении самоочищающей способности и негативных изменениях развития и функциональной активности организмов почвенного биоценоза (Пиковский и др., 2003; Stroud et al., 2007). Аварийные и хронические разливы нефти приводят к быстрой потере продуктивности земель или полной деградации ландшафтов. Ограниченность земельных ресурсов ставит неотложную задачу возврата в хозяйственное использование всех нарушенных и деградированных почв (Бурмистрова, 2003).

Поскольку на современном уровне развития нефтяной промышленности не представляется возможным полностью исключить её негативное воздействие на окружающую среду, возникает необходимость разработки методов и технологий восстановления почв, загрязнённых нефтяными углеводородами (Сулейманов и др., 2005). Экологически перспективными являются микробиологические способы очистки от нефтезагрязнений, основанные на стимулировании роста и активности природных микроорганизмов (биостимуляция) или внесении в почву селекционированных микроорганизмов-деструкторов (биоаугментация) (Нечаева и др., 2009; Киреева и др., 2009; Mishra et al., 2001; Wilkinson et al., 2002; Ouyang et al., 2005).

В связи с тем, что деструкция нефти в окружающей среде – сложный многофакторный процесс, на который оказывают влияние физико-химический состав, концентрация и срок действия загрязнителя, почвенно-климатические и биологические особенности экосистемы и другие факторы, сведения по этой проблеме нередко противоречивы.

При разработке приёмов микробной ремедиации нефтезагрязнённых почв, выборе оптимального способа очистки необходим комплексный подход. Анализ изменений, происходящих в микробных сообществах нефтезагрязнённых почв, путём определения численности микроорганизмов различных физиологических групп, выделения и идентификации микроорганизмов-деструкторов углеводов, изучения почвенной биодинамики на основании оценки активности ферментов в почве и определения интенсивности почвенного «дыхания», исследования динамики агрохимических показателей почвы с параллельным химическим анализом остаточного содержания в ней нефтяного загрязнителя и оценкой степени её токсичности, позволит разработать параметры микробиологических процессов в нефтезагрязнённых почвах, при которых нарушенные почвы возвращаются в устойчивое состояние.

Несмотря на многочисленные исследования микроорганизмов-деструкторов нефтяных углеводородов в окружающей среде, механизмы их функционирования в экстремальных условиях, например, в кислых почвах, обусловленных естественными или антропогенными факторами, которых немало на территории России и других стран (Широких, 2004; Орлов и др., 2005; Rothschild, Mancinelli, 2001), изучены

недостаточно. Многие экологические аспекты проблемы биоаугментации, касающиеся жизнеспособности и активности интродуцированных микроорганизмов в почве, их взаимоотношений с аборигенным микробоценозом, требуют всестороннего изучения. В связи с этим, разработка высокоспецифичных и чувствительных мониторинговых методов для идентификации внесённых в почву бактерий особенно актуальна.

Кроме того, для реализации принципов и практических мер, направленных на охрану почв, необходимо разработать оптимальные методы биотестирования, позволяющие построить наиболее полную картину деградации почв, получить интегральную токсикологическую характеристику загрязнённой среды до и после очистки, и, следовательно, оценить эффективность приёмов биоремедиации.

Цель и задачи исследований. Цель работы – выявление особенностей функционирования естественных микробных сообществ нефтезагрязнённых почв и интродуцированных в почву специализированных микроорганизмов при использовании приёмов биоремедиации.

Для достижения поставленной цели были определены задачи:

1. Исследовать биологические и эколого-функциональные свойства микробного сообщества нефтешлама с низким значением рН. Изучить генетические особенности кислотоустойчивых углеводородокисляющих микроорганизмов, выделенных из нефтешлама.

2. Провести сравнительную оценку жизнеспособности и динамики развития микроорганизмов *Dietzia maris* AM3 и *Bacillus* sp. УН 2/5 при их интродукции в загрязнённые нефтью кислые и нейтральные почвы. Изучить стабильность свойств реизолятов штамма *D. maris* AM3.

3. Исследовать влияние интродукции нефтеокисляющих микроорганизмов на характер микробиологических и биохимических процессов в загрязнённой почве и деструкцию нефтяных углеводов.

4. Разработать и апробировать иммунохимические методы анализа для мониторинга штамма *D. maris* AM3 в нефтезагрязнённой почве в процессе биоремедиации.

5. Провести сравнительное исследование функционирования микробных сообществ почвы с разным сроком нефтяного загрязнения при самоочищении и использовании приёмов биостимуляции и биоаугментации.

6. Выявить оптимальные показатели для мониторинга процессов микробной ремедиации почв и разработать метод биотестирования для оценки уровня токсичности почвы после очистки.

7. Разработать и апробировать оригинальный способ активизации аборигенных углеводородокисляющих микроорганизмов для очистки нефтезагрязнённой почвы и воды.

Научная новизна. Впервые из микробного сообщества, существующего в экстремальных условиях нефтешлама (рН 1,15), выделены и изучены 13 штаммов бактерий, идентифицированные как *Corynebacterium* spp., *D. maris* и *Bacillus* sp., способные к деструкции углеводов в широком диапазоне рН. Получены доказательства плазмидной локализации генов, детерминирующих свойства биodeградации нефтяных углеводов и ацидотолерантности у данных штаммов, что может обеспечить преимущества микроорганизмов сообщества при существовании в экстремальных условиях. Впервые подробно изучен и охарактеризован штамм *D. maris* AM3 как эффективный и стабильный деструктор

алкановых и ароматических углеводородов в широком диапазоне рН (4-9) и температуры (10-40°C), обладающий эмульгирующей активностью по отношению к нефтепродуктам и содержащий трансмиссивную плазмидную ДНК. Установлено, что после культивирования штамма на углеводородных субстратах увеличивается гидрофобность его клеток и нефтеокисляющая активность.

Разработаны иммунохимические методы анализа для выявления и количественной оценки штамма *D. maris* АМЗ в нефтезагрязнённой почве в процессе биоремедиации. Установлены особенности развития интродуцированных микроорганизмов *D. maris* АМЗ и *Bacillus* sp. УН 2/5 в нефтезагрязнённых кислых и нейтральных почвах, подтверждена их высокая конкурентная способность по отношению к микроорганизмам естественных почвенных сообществ, жизнеспособность и нефтеокисляющая активность. С помощью метода твёрдофазного иммуноферментного анализа (ИФА) показано, что максимальное развитие штамма *D. maris* АМЗ в почве происходит через 7-14 сут. интродукции и зависит от свойств почвы и загрязнителя.

На основании выявленных особенностей функционирования естественных микробных сообществ загрязнённых почв и интродуцированных нефтеокисляющих микроорганизмов разработаны научные основы применения и совершенствования технологий микробной ремедиации нефтезагрязнённых почв. Научно аргументирована и экспериментально доказана перспективность использования штаммов *D. maris* АМЗ и *Bacillus* sp. УН 2/5 для очистки почв со свежим нефтяным загрязнением, которые не только ускоряют очистку в два раза в течение первого месяца ремедиации по сравнению с приёмом стимуляции, но также повышают биологическую активность почвы и способствуют снижению её токсичности. Установлено, что эффективность ремедиации при стимуляции естественного микробного сообщества почвы со свежим нефтяным загрязнением выше, чем при самоочищении, что выражается в увеличении степени деструкции нефтяных углеводородов и биологической активности почвы и снижении её токсичности. В случае многолетнего загрязнения показана одинаковая убыль нефтяных углеводородов при стимуляции аборигенной микрофлоры и интродукции штамма *D. maris* АМЗ, который на определённых этапах ремедиации повышает биологическую активность и снижает токсичность почвы.

Выявлены диагностические показатели по ферментативной активности для оценки эффективности апробируемых биоремедиационных приёмов. Разработан метод определения токсичности нефтезагрязнённой почвы после биоремедиации по дегидрогеназной активности бактерий. Предложена новая комбинация добавок, стимулирующих развитие аборигенных углеводородоокисляющих микроорганизмов в образцах загрязнённой почвы, для получения биопрепаратов в виде почвенной суспензии.

Практическая значимость. Выделенные и охарактеризованные ацидотолерантные нефтеокисляющие бактерии *Corynebacterium* spp., *D. maris* и *Bacillus* sp. могут быть использованы для ремедиации нефтезагрязнённых почв с повышенной кислотностью. Бактериальные культуры *D. maris* АМЗ и *Bacillus* sp. УН 2/5 могут быть рекомендованы для ускорения и улучшения очистки почвы от свежего нефтяного загрязнения. Высокая жизнеспособность, конкурентоспособность и углеводородоокисляющая активность позволяет применять эти штаммы в условиях, когда естественное микробное сообщество почвы малочисленно или не способно полноценно функционировать. Для очистки почв с многолетним загрязнением

разработан способ стимуляции аборигенной микрофлоры путём внесения минерального удобрения, структуратора, ПАВ и использования агротехнических приёмов. Результаты по способам очистки почвы от нефтяных загрязнений защищены двумя патентами РФ.

Метод твёрдофазного ИФА может быть рекомендован для практического применения при проведении биоремедиационных работ в качестве способа учёта численности интродуцированных микроорганизмов. Анализ показателей активности почвенных ферментов: дегидрогеназ, каталаз, липаз и уреаз может быть использован для оценки эффективности приёмов биоремедиации. Предложен метод определения токсичности нефтезагрязнённой почвы после биоремедиации по дегидрогеназной активности бактерий. Разработан способ получения и использования биопрепаратов в виде почвенной суспензии, основанный на активизации аборигенных углеводородоокисляющих микроорганизмов в образцах загрязнённой почвы.

Результаты исследования применяются при проведении лекционных и практических занятий по курсу «Экологическая токсикология», «Механизмы обезвреживания токсичных соединений», подготовке курсовых и дипломных работ в ГОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» и ИБФРМ РАН. Материалы диссертации использованы при подготовке учебно-методических пособий: «Руководство к практическим занятиям по экологической токсикологии» (Саратов, 2006); «Общая биология: Материалы к гос. аттестации выпускников по спец. 011600 – «Биология»» (Саратов, 2006); «Экология. Материалы к государственной аттестации выпускников по специальности – «Экология»» (Саратов, 2009).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В состав микробного сообщества нефтешлама с экстремальной кислотностью (рН 1,15) входят микроорганизмы *Corynebacterium* spp., *D. maris* и *Bacillus* sp., осуществляющие деструкцию нефтяных углеводов в кислой и нейтральной среде. Свойства ацидотолерантности у бактерий *Corynebacterium* spp. и деградации нефтяных углеводов у *D. maris* АМЗ, детерминируемые плазмидными генами, способствуют устойчивому функционированию микробного сообщества нефтешлама.

2. Штамм *D. maris* АМЗ обладает рядом функциональных и экологических преимуществ, связанных со способностью к существованию в широком диапазоне рН и температуры, наличием биоэмульгирующей и деструктивной активности по отношению к алкановым и ароматическим углеводородам нефти и присутствием трансмиссивной катаболической плазмиды, характеризующейся высокой стабильностью. Адаптационным механизмом при культивировании *D. maris* АМЗ на углеводородах является увеличение гидрофобности его клеток.

3. Интродуцированные микроорганизмы *D. maris* АМЗ и *Bacillus* sp. УН 2/5 характеризуются высокой жизнеспособностью в нефтезагрязнённых кислых и нейтральных почвах, они ускоряют очистку почв от свежего нефтяного загрязнения, повышая численность гетеротрофных и углеводородоокисляющих микроорганизмов в естественном сообществе, интенсифицируя биологическую активность почвы и снижая её токсичность.

4. Для выявления *D. maris* АМЗ в почве в процессе биоремедиации и количественной оценки динамики его численности применимы иммунохимические методы анализа. С помощью метода твёрдофазного иммуноферментного анализа установлено, что при интродукции штамма *D. maris* АМЗ в почву, его максимальное

развитие происходит через 7-14 суток (на 1-3 порядка в зависимости от свойств почвы и загрязнителя).

5. Способ стимуляции естественного микробного сообщества в чернозёме южном со свежим нефтяным загрязнением имеет существенные преимущества по сравнению с самоочищением. В случае многолетнего загрязнения показана одинаковая убыль нефтяных углеводородов при стимуляции аборигенной микрофлоры и интродукции штамма *D. maris* AM3.

6. Показатели активности почвенных ферментов: дегидрогеназ, каталаз, липаз и уреаз отражают направленность процессов биодegradации нефтяных углеводородов, обусловленных развитием и активизацией аборигенных и интродуцированных микроорганизмов в почве, и могут быть использованы для оценки эффективности приёмов биоремедиации. Показатель дегидрогеназной активности бактерий может использоваться для тестирования токсичности очищенной почвы.

7. Активизация аборигенных углеводородокисляющих микроорганизмов в образцах загрязнённой почвы с помощью стимулирующих добавок обеспечивает получение эффективных биопрепаратов в виде почвенной суспензии для использования в процессе биоремедиации.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлены в виде стендовых и устных сообщений на Международной конференции «Микробное разнообразие: состояние, стратегия, экология, проблемы» (Пермь, 1996); II International Symposium on Biosorption and Bioremediation (Prague, Czech Republic, 1998); 9th European Congress on Biotechnology (Brussels, Belgium, 1999); 7th и 8th International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil (Leipzig, Germany, 2000; Gent, Belgium, 2003); II и V съездах Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Санкт-Петербург, 2000; Москва, 2009); 9th International Symposium on Microbial Ecology (Amsterdam, The Netherlands, 2001); конференции «Экобиотехнология: борьба с нефтяным загрязнением окружающей среды» (Пушино, 2001); Xth International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (Paris, France, 2002); 3rd International Conference OIL POLLUTION: Prevention, Characterization, Clean Technology (Gdańsk, Poland, 2002); I-IV межрегиональных конференциях молодых учёных «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2002, 2004, 2006, 2008); Всероссийских научно-практических конференциях, посвящённых 115-летию и 117-летию со дня рождения академика Н.И. Вавилова (Саратов, 2002, 2004); I-III Международных конгрессах «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2002, 2003, 2005); International Symposium Biochemical Interactions of Microorganisms and Plants with Technogenic Environmental Pollutants (Saratov, Russia, 2003); II Международной научной конференции «Биотехнология – охране окружающей среды» (Москва, 2004); Международной научной конференции «Проблемы биодеструкции техногенных загрязнителей окружающей среды» (Саратов, 2005); II Международной конференции «Микробное разнообразие: состояние, стратегия сохранения, биологический потенциал» (Пермь-Казань, 2005); Всероссийской Молодёжной школе-конференции «Актуальные проблемы современной микробиологии» (Москва, 2005); Международной научной конференции «Микробные биотехнологии» (Одесса, 2006); Международной научной конференции «Микроорганизмы и биосфера» (Москва, 2007); EGU General Assembly (Vienna, Austria, 2008); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биоэкологии» (Москва, 2008); IV Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы экологии Южного Урала» (Оренбург, 2009); IV

Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Экологические проблемы промышленных городов» (Саратов, 2009); Первых Международных научно-практических Беккеровских чтениях (Волгоград, 2010); XXII зимней молодёжной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2010); Московской международной научно-практической конференции «Биотехнология: экология крупных городов» (Москва, 2010); II Всероссийской научной интернет-конференции «Научное творчество XXI века» с международным участием (2010); совместном заседании лаборатории экологической биотехнологии ИБФРМ РАН и кафедры биохимии и биофизики СГУ (2005-2010 гг.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 62 научные работы, из них 10 публикаций в изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК РФ, включая два патента РФ.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 5 глав с изложением результатов работы и их обсуждением, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 443 источника. Диссертация изложена на 358 страницах машинописного текста, включая приложение, содержит 85 рисунков и 29 таблиц.

Работа выполнена в лаборатории экологической биотехнологии ИБФРМ РАН в соответствии с плановой темой НИР «Исследование взаимодействия микроорганизмов и растений с техногенными загрязнителями окружающей среды» (№ гос. регистрации 01.9.90 003293, научный руководитель зав. лаб. профессор, д.б.н. Турковская О.В.) и кафедре биохимии и биофизики СГУ по заданию Минобразования и науки РФ по теме «Исследование влияния биотических и абиотических факторов на структуру и функционирование экосистем и популяций» (научный руководитель зав. каф. ботаники и экологии СГУ профессор, д.б.н. Болдырев В.А.). Работа поддержана Грантом Президента РФ № МК-1968.2003.04.

Благодарности. Выражаю искреннюю благодарность научному консультанту профессору, д.б.н. Турковской О.В., сотрудникам лаборатории экологической биотехнологии ИБФРМ РАН и особенно: к.б.н. Дубровской Е.В. за проведение совместных микрополевых исследований, к.б.н. Поздняковой Н.Н. за совместную разработку оригинального способа активизации аборигенных углеводородоксилирующих микроорганизмов, к.б.н. Голубеву С.Н. за помощь в проведении генетических исследований, а также д.б.н. Матора Л.Ю., к.б.н. Бурьгину Г.Л., к.х.н. Макарову О.Е. и коллегам с кафедры биохимии и биофизики СГУ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МИКРОБНАЯ ДЕГРАДАЦИЯ НЕФТЯНЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ В ЗАГРЯЗНЁННЫХ ПОЧВАХ

В главе приводится обзор современного состояния остройшей экологической проблемы – загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами, рассмотрено токсическое воздействие нефтяных углеводородов на живые организмы, характер изменений физико-химических и биологических свойств почвы при нефтяном загрязнении, особенно подробно описано его влияние на ферментативную активность почв в связи с возможным использованием показателей активности почвенных ферментов для мониторинга технологий биоремедиации. Изложены основные принципы микробной

деградации нефтяных углеводородов, представлено описание микроорганизмов-деструкторов нефтяных углеводородов, их физиологических особенностей, приведены пути микробной деструкции нефтяных углеводородов, подробно описаны бактерии рода *Rhodococcus*, их экологическое значение и генетическая организация.

В данной главе рассмотрены основные факторы, влияющие на эффективность биоремедиации, проанализированы проблемы и перспективы интродукции нефтеокисляющих микроорганизмов в загрязнённую почву. При обобщении сведений о способах микробной очистки нефтезагрязнённых почв и методах контроля биоремедиации, делается вывод, что вопросы целесообразности использования и преимуществ технологий биостимуляции и биоаугментации остаются спорными, деградация нефтяных углеводородов бактериями в экстремальных условиях, например, в почве при пониженных значениях pH, изучена недостаточна. Проблемы биологического мониторинга почв после биоремедиации, изучения жизнеспособности внесённых в загрязнённую почву микроорганизмов требуют оптимального решения.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследований являлись 13 штаммов, выделенных из нефтешлама (pH 1,15) (г. Саратов). Кроме того, в работе использовали штаммы из коллекции почвенных свободноживущих и ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН: 14 штаммов *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus* TM-31, *Rhodococcus terrae* A73 и 5 штаммов рода *Rhodococcus*: *R. rhodochrous* M8, *R. rhodochrous* rh, *R. erythropolis* Hx7, *Rhodococcus* sp. 261 и *Rhodococcus* sp. 2/4 из коллекции микроорганизмов ЗАО «Биоамид». Для установления специфичности антител *D. maris* AM3 применяли штаммы *D. maris* ИЭГМ 44 и *D. maris* ИЭГМ 305 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (г. Пермь).

Работа выполнялась на базе лаборатории экологической биотехнологии ИБФРМ РАН и кафедры биохимии и биофизики СГУ (1999–2010 гг.).

Способность микроорганизмов и их мутантных клонов использовать для роста нефть и нефтепродукты определяли с помощью чашечного метода Мак-Кланга, согласно которому отмечалось наличие роста культуры вокруг и внутри капель нефтяного субстрата на поверхности плотной минеральной среды (Теппер и др., 1993). Способность микроорганизмов и их мутантных клонов к деструкции индивидуальных углеводородов парафинового ряда (0,4 г/л) определяли с помощью метода лунок (Егоров, 1976). Биотрансформирующую активность бактерий изучали в жидкой минеральной среде М9 с добавлением к ней в качестве единственного источника углерода одного из следующих субстратов, в процентах по весу: нефти (1,0), мазута (2,5), индивидуальных углеводородов: гептадекана (2,5), гексадекана (1,0), толуола (1,0) или декалина (1,0). Деградиацию углеводородных субстратов исследуемыми культурами изучали в жидкой среде при различных значениях pH (3,5; 4,6; 5,0 и 7,0).

Деструктивную активность микроорганизмов устанавливали при их культивировании в жидких средах по остаточному содержанию нефтяных углеводородов гравиметрическим методом (Инструкция по контролю за состоянием почв..., 1990) или ИК-спектроскопией (Государственный контроль качества воды..., 2003) на спектрофотометре «Spectord IR-75» после их экстракции четырёххлористым

углеродом. Деструкцию гептадекана, гексадекана и декалина оценивали методом газовой хроматографии (Хроматографический анализ..., 1979; Ларионова и др., 2005; Другов, Родин, 2007). Степень деструкции толуола рассчитывали на основании данных, полученных с помощью УФ-спектрофотометрии (Осипов, Белова, 1968). Оптическую плотность бактериальной суспензии штамма *D. maris* AM3, культивируемого на минеральной среде с гексадеканом (1,0%), определяли путём измерения на фотоколориметре КФК-2 при $\lambda=540$ нм через 1, 3 и 7 сут. культивирования. Прирост бактериальной биомассы определяли весовым методом (Стабникова и др., 1995). Эмульгирующую активность бактерий (экзогенную и эндогенную) определяли методом Купера (Cooper, Goldenberg, 1987). Для изучения гидрофобности клеток штамма *D. maris* AM3 и его реизолятов применяли метод Е.В. Серебряковой с соавт. (2002), основанный на адсорбции бактериальных клеток на поверхности капель хлороформа.

Генетическую природу свойств деградации нефтяных углеводородов и кислотолерантности изучали путём спонтанной элиминации этих свойств и индуцированной элиминации с использованием субингибирующих концентраций профлавина и налидиксовой кислоты (Миллер, 1976). Трансмиссивность свойства биodeградации углеводородов нефти с помощью конъюгационного переноса исследовалась по стандартной методике (Chakrabarty, 1980) с различными модификациями. Для трансформации клеток плазмидной ДНК применяли комбинированную методику, основанную на сочетании двух классических методов: кальциевой обработки и криотрансформации (Гловер, 1988). Плазмидную ДНК в исходных штаммах и предполагаемых элиминантах выявляли с помощью метода выделения, разработанного С.Н. Голубевым (2002), и последующего электрофореза в агарозном геле. Молекулярный размер плазмид определяли, сравнивая их электрофоретическую подвижность с подвижностью реперных плазмид, используя компьютерную программу «One-Dimensional Gel Analysis».

Приёмы микробной ремедиации исследовали в лабораторных экспериментах (почва со свежим загрязнением нефтью) и микрополевым (смешанный грунт с многолетним загрязнением нефтепродуктами). Для очистки от свежего нефтяного загрязнения использовали чернозём южный и тёмно-серую лесную почву, отобранные в Саратовской области. Почву инкубировали в пластмассовых контейнерах при температуре 25°C. В микрополевым масштабе грунт очищался на специально оборудованной площадке в естественных условиях. Для стимуляции естественных микробных сообществ в почву вносили отдельно или в различных комбинациях: минеральное удобрение азофоску, являющееся источником азота и фосфора, древесные опилки в качестве структуратора и неонол АФ9-12-С в качестве эмульгатора. В случае аугментации в почву и грунт интродуцировали штамм *D. maris* AM3 в количестве 1×10^7 КОЕ/г почвы совместно со стимулирующими добавками, штамм *Bacillus* sp. УН2/5 вносили в почву в количестве 5×10^7 КОЕ/г почвы. В процессе очистки почвы и грунта регулярно проводили агротехническую обработку: рыхление один раз в неделю и поддержание влажности на уровне ~ 10-15%.

Динамика численности интродуцированного штамма *D. maris* AM3 изучалась методом подсчёта характерных ярких кораллово-красных колоний на МПА (Практикум по микробиологии..., 2005), параллельно проводился твёрдофазный ИФА (вариант ELISA) (Иммуноферментный анализ..., 1988). Присутствие *D. maris* AM3 в образцах почвенных суспензий выявляли с помощью кроличьих антител, специфичных к углеводным антигенам данного штамма. В качестве ферментной

метки использовали пероксидазу хрена, конъюгированную с козьими антикроличьими антителами. Субстратным реагентом являлся орто-фенилендиамин с перекисью водорода. Измерения оптической плотности исследуемых проб проводили при длине волны $\lambda=490$ нм на иммуноферментном анализаторе АИФ-Ц-01С с последующей обработкой результатов с помощью программы ЛабАРМ. Численность штамма *Bacillus* sp. УН2/5 оценивалась на селективной среде с антибиотиками. Общую гетеротрофную микрофлору (ОГМ) в почве во всех экспериментах учитывали общепринятым методом на МПА (Практикум по микробиологии..., 2005). Угледородоокисляющие микроорганизмы (УОМ) выявляли на агаризованной минеральной среде с дизельным топливом в качестве единственного источника углерода и энергии (Гузев и др., 1997), а также с помощью метода мембранных фильтров на среде с нефтью в качестве единственного источника углерода (А.с. СССР №1629319..., 1991). Количество клеток микроорганизмов азотного цикла определяли методом предельных разведений (Практикум по микробиологии..., 2005). Разведения почвенной суспензии высевали на соответствующие питательные среды: на среде Виноградского учитывали нитрифицирующие микроорганизмы; на среде Гильтея – денитрифицирующие; на мясопептонном бульоне (МПБ) – аммонифицирующие. Наиболее вероятное число микроорганизмов в единице объёма рассчитывали по таблице Мак-Креди, разработанной на основании методов вариационной статистики. Экологическую совместимость *D. maris* AM3 с естественной почвенной микрофлорой изучали методом лунок и перекрёстных посевов (Руководство для большого практикума по микробиологии..., 1981).

Дыхательную активность почвы измеряли согласно (Основные микробиологические и биохимические методы..., 1987). Активность дегидрогеназ в почве определяли колориметрически на КФК-2 по восстановлению 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ), активность каталаз измеряли с помощью титриметрического метода Р.С. Кацнельсона и В.В. Ершова (Хазиев, 2005). Активность уреаз в почве определяли колориметрическим методом путём измерения количества аммиачного азота (Временные методические рекомендации..., 1984). Активность триацилглицерол-липаз в почве определяли титриметрическим методом К.А. Козловой, В.П. Кислицыной, Ю.А. Марковой и Э.Н. Михайловой (1968) (Хазиев, 2005). Количество в почве общего и растворимого углерода определяли методом И.В. Тюрина, подвижного фосфора (P_2O_5) – с использованием солянокислой почвенной вытяжки (Временные методические рекомендации..., 1984), концентрацию в почвенных микрокосмах нитратного и аммонийного азота – согласно (Практикум по агрохимии..., 1987) и (Андреюк и др., 1988) соответственно. рН почвы измеряли согласно (ГОСТ 26483-85. Почвы).

Остаточное содержание нефтяных углеводов в почве определяли гравиметрическим методом (РД 52.18.647-2003. Методические указания..., 2003), извлекая сумму неполярных и малополярных углеводов из почвенного образца четырёххлористым углеродом с одновременной очисткой элюата на окиси алюминия в хроматографической колонке. Анализ фракций нефтепродуктов проводили в соответствии с методом Л.Г. Полуниной и Г.И. Кушина (Методы анализа органического вещества пород, нефти и газа..., 1977). Токсичность почвы до и после ремедиации оценивали в фитотесте на трёхсуточных проростках пшеницы сорта «Саратовская 29» и редиса сорта «Заря» по следующим показателям: всхожесть семян, %; средняя длина ростка и средняя длина корня (корневой системы для пшеницы), мм (Остроумов, 1990). Определение токсичности почвы проводили также

разработанным нами методом по дегидрогеназной активности штамма *D. maris* АМЗ путём сравнения количества 2,3,5-трифенилформаза (ТФФ), образованного дегидрогеназами тест-микроорганизма, в опытных и контрольных образцах.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы Microsoft Excel 2003. Достоверность различий полученных результатов оценивали с использованием коэффициента Стьюдента ($P > 0,95$).

3. ИЗУЧЕНИЕ РЯДА БИОЛОГИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ КИСЛОТОУСТОЙЧИВЫХ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ ШТАММОВ

При разработке приёмов биоремедиации нефтезагрязнённых почв, характеризующихся повышенной кислотностью, было изучено микробное сообщество нефтешлама (г. Саратов) с крайне низким значением рН (рН 1,15). Из состава данного экстремального сообщества выделено 13 микробных штаммов. Штаммы с лабораторными шифрами УН 1/1; УН 1/2; УН 2/1м; УН 2/1к; УН 2/2м; УН 2/3м; УН 3/1; УН 3/2; УН 4/1 и УН 4/2 по совокупности изученных морфологических, хемотаксономических, физиолого-биохимических признаков были идентифицированы как *Corynebacterium* sp., два штамма: УН 1/3 и АМЗ – как *Dietzia maris*, один штамм УН 2/5 – как *Bacillus* sp. В ходе исследований установлено, что все выделенные микроорганизмы, входящие в состав микробного сообщества нефтешлама, в разной степени устойчивы к повышенной кислотности среды, они росли в мясопептонном бульоне в диапазоне рН 1-7 (табл. 1).

Таблица 1.

Показатели роста микроорганизмов через 7 сут. культивирования в МПБ в интервале рН от 1 до 7 при исходной посевной дозе ($OD_{540}=0,4$ ед.)

Штаммы	Оптическая плотность (OD_{540}) при различных значениях рН			
	7	5	3	1
<i>Corynebacterium</i> sp. УН 1/1	0,97±0,05	0,20±0,03	0,48±0,04	0,52±0,05
<i>Corynebacterium</i> sp. УН 1/2	1,16±0,07	0,24±0,03	0,54±0,04	0,50±0,05
<i>D. maris</i> УН 1/3	3,00±1,17	2,50±1,11	1,39±0,05	0,86±0,06
<i>Corynebacterium</i> sp. УН 2/1к	1,20±0,05	0,65±0,05	0,44±0,04	0,47±0,04
<i>Corynebacterium</i> sp. УН 2/1м	1,35±0,06	0,85±0,05	0,77±0,04	0,64±0,05
<i>Corynebacterium</i> sp. УН 2/2м	1,40±0,05	0,95±0,06	0,72±0,04	0,66±0,05
<i>Corynebacterium</i> sp. УН 2/3м	1,65±0,08	1,20±0,05	0,89±0,04	0,67±0,05
<i>Bacillus</i> sp. УН 2/5	2,24±0,12	1,84±1,0	1,29±0,05	0,84±0,06
<i>Corynebacterium</i> sp. УН 3/1	1,55±0,05	1,08±0,09	0,83±0,05	0,67±0,06
<i>Corynebacterium</i> sp. УН 3/2	1,06±0,08	0,79±0,07	0,56±0,04	0,48±0,04
<i>D. maris</i> АМЗ	3,20±0,19	2,68±1,11	1,92±0,07	0,77±0,05
<i>Corynebacterium</i> sp. УН 4/1	1,56±0,06	1,08±0,04	0,89±0,05	0,56±0,05
<i>Corynebacterium</i> sp. УН 4/4	1,45±0,06	1,12±0,05	0,51±0,05	0,18±0,02

Бактерии были охарактеризованы как умеренные ацидофилы. Как известно, способность к росту при низких и высоких значениях рН обеспечивает микроорганизмам определённые преимущества в окружающей среде, т.к. в таких условиях конкуренция со стороны большинства других организмов невелика. Выявленный широкий диапазон роста данных штаммов мог свидетельствовать об их

приспособленности к изменяющимся условиям природной среды, что представляло интерес для практического использования бактерий в биоремедиации загрязнённых почв.

При изучении деструктивного потенциала микроорганизмов сообщества нефтешлама было показано, что все выделенные штаммы обладали способностью к росту на агаризованной среде, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии спектр углеводородных субстратов: сырую нефть, керосин, вазелиновое масло, дизельное топливо, ряд индивидуальных углеводородов: *n*-алканы и ароматические соединения (табл. 2).

Таблица 2.

Субстратный спектр исследуемых микроорганизмов

Субстрат	Оценка роста штаммов													
	1/1	1/2	1/3	2/1к	2/1м	2/2м	2/3м	2/5	3/1	3/2	4/1	4/4	АМЗ	
Сырая нефть	+	+-	+	+	+-	+	+-	+	+-	+	+	+	+	
Вазелиновое масло	-	-	+-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	
Дизельное топливо	-+	-+	+	-+	+-	+-	-+	+	+-	+-	-	+-	+	
Керосин	-+	-+	+	-+	+-	+-	+-	+	-+	-	-	+-	-	
<i>n</i>-алканы:														
Октан	-+	-+	+	-+	-+	+-	+-	+	+	-+	+-	+-	+	
Гексан	+-	-+	+	+-	-+	+-	+-	+	-+	+-	+-	-+	+	
Гептан	+-	-+	+	+-	-+	+-	+-	+	-+	-+	+-	-+	+	
Декан	-+	-+	+	+-	-+	+-	+-	+	-+	-+	+	+	+	
Тридекан	-+	-+	+	+-	-+	-+	-+	+	-+	-+	+	+	+	
Гексадекан	-+	-+	+	-+	-+	-+	-+	+	+-	-+	+-	+-	+	
Гептадекан	-+	-+	+	-+	-+	-+	-+	+-	-+	-+	+-	+-	+	
Ароматические углеводороды:														
Бензол	-	+-	+	+-	-	+-	-	+	-	-	+-	+-	+	
Толуол	-+	-	+	-	-	-+	+-	+	-+	+-	+-	+-	+	
Ксилол	-	-+	+	+-	-+	-	-	+	-+	+-	+	+-	+	
Фенол	-+	-+	+	-+	-+	+-	+-	+	-+	+-	+-	-+	+	
Псевдокумол	+-	+-	+	-+	-+	-+	-	+	+	-+	+	+	+	
Амилбензол	-	-	+	+-	-	-	-+	+	-+	+-	-	+	+-	
Нафты:														
Декалин	-+	-+	+	-	+-	-	-+	+	-+	-+	+-	-+	+	

Примечания: «-» – отсутствие роста; «-+» – едва выраженный рост; «+-» – небольшой рост; «+» – отчётливый рост.

По результатам качественного анализа было выделено несколько наиболее активных штаммов-деструкторов нефтяных углеводородов: *D. maris* УН 1/3, *Bacillus* sp. УН 2/5 и *D. maris* АМЗ. По данным ИК-спектроскопии деструкция нефти в жидкой среде при рН 3,5 изучаемыми штаммами составила от 29 до 47% за 14 сут. культивирования. У большинства штаммов деструкция углеводородов нефти в кислой среде происходила более эффективно, чем в нейтральной, например, у штаммов: *Bacillus* sp. УН 2/5, *D. maris* УН 1/3 и *Corynebacterium* sp. УН 4/1, которая составила 46,4, 44,0 и 29,6% соответственно (рис. 1). Штамм *D. maris* АМЗ свою максимальную деструктивную активность (до 70%) проявлял при нейтральных значениях рН,

степень деструкции нефтяных углеводородов при культивировании этого штамма в среде с рН 3,5 составляла 47%.

Наблюдался значительный прирост биомассы *D. maris* АМЗ по сырому весу при культивировании штамма на минеральной среде с гексадеканом (10 г/л) в течение 7 сут., который составлял 1,38 г/л при рН 5,0 и 1,62 г/л при рН 7,0, что свидетельствовало о том, что данный углеводород является источником углерода и энергии, обеспечивающим активный рост клеток при исследуемых значениях рН.

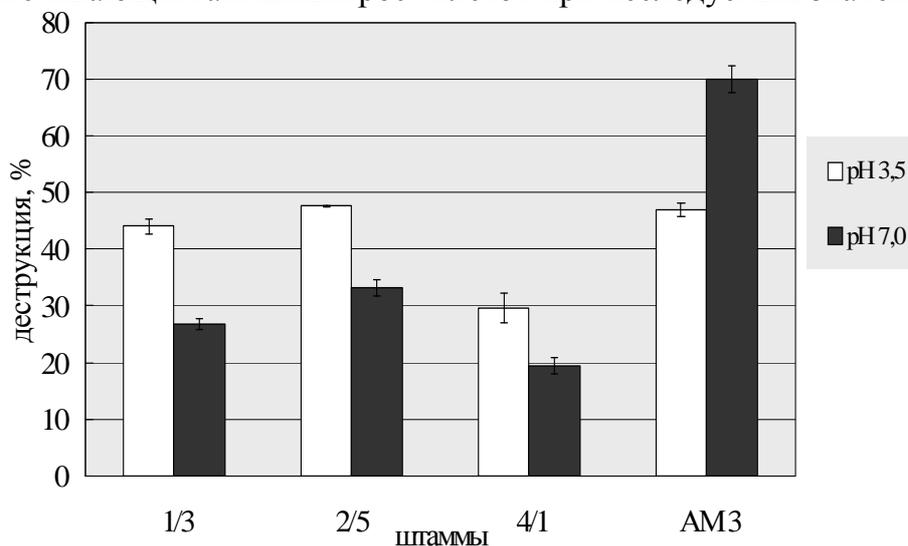


Рис. 1. Деструктивная активность штаммов по отношению к сырой нефти (10 г/л) при культивировании их в жидкой среде в течение 14 сут.

Степень деструкции гептадекана (25 г/л) штаммом *D. maris* АМЗ в жидкой среде за 7 сут. культивирования составляла 53,6% при рН 7,0 и 51,5% при рН 4,6; толуола (10 г/л) – 80,6% при нейтральном рН. Представитель нафтеновых углеводородов – декалин (10 г/л) разрушался штаммом *D. maris* АМЗ в жидкой среде при рН 7,0 на 9,5%. Данный штамм также осуществлял деградацию мазута (25 г/л) на 8,1% в жидкой среде за 14 сут. культивирования (рис. 2).



Рис. 2. Рост штамма *D. maris* АМЗ в жидкой среде с мазутом (25 г/л) в сравнении с контрольной незасеянной колбой

Таким образом, показано, что штамм *D. maris* АМЗ способен к деструкции как алкановых, так и ароматических углеводородов нефти. Данные особенности делают штамм особенно перспективным для его практического использования в биоремедиации нефтезагрязнённых природных объектов, т.к. деструкторы алканов, как известно из литературных данных (Churchill et al., 1999), обычно не затрагивают ароматические кольца углеводородов. К редкому сочетанию деструктивных свойств у штамма *D. maris* АМЗ добавляется также возможность осуществления им утилизации нефтяных углеводородов в условиях повышенной кислотности.

У *D. maris* AM3 была обнаружена эмульгирующая активность по отношению к нефти, экзогенная активность составляла: $E_{24} = 49,3\%$ и $E_{48} = 37,3\%$, эндогенная – $E_{48} = 15,0\%$, что свидетельствовало о возможных преимуществах штамма в процессах утилизации нефтепродуктов, т.к. биоэмульгирующая активность микроорганизма в сочетании с биодеградирующей способностью может обеспечить большую биодоступность углеводов в различных условиях. Показано, что *D. maris* AM3 обладал также рядом экологических преимуществ, т.к. хорошо рос как на МПА, так и на агаризованной минеральной среде с нефтью в качестве единственного источника углерода и энергии в диапазоне pH: 4-9 и температуры: 10-40°C и в присутствии 10% NaCl.

В целом, полученные результаты свидетельствовали о перспективности использования штаммов микробного сообщества нефтешлама для очистки нефтезагрязнённых объектов окружающей среды, характеризующихся повышенной кислотностью. Штаммы хранятся в коллекции почвенных свободноживущих и ризосферных микроорганизмов Учреждения Российской академии наук Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов (г. Саратов).

4. ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ КИСЛОТОУСТОЙЧИВЫХ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ ШТАММОВ

Известно, что на плаزمидах часто локализованы гены, кодирующие биодеградиацию органических соединений или устойчивость к абиотическим факторам окружающей среды (Измалкова и др., 2005; Whyte et al., 1998; Singh, Ward, 2004). В ходе выявления механизмов адаптационной устойчивости микроорганизмов сообщества нефтешлама к повышенной кислотности среды и определения природы генетического детерминирования признака деградации углеводов нефти у исследуемых микроорганизмов был осуществлён плазмидный скрининг по PEG-DEX методу (Голубев, 2002). У десяти ацидотолерантных углеводородокисляющих штаммов *Corynebacterium* spp. обнаружены плазмидные ДНК, сходные по размеру (около 45-50 т.п.н.), у двух штаммов *D. maris* AM3 и *D. maris* УН 1/3 обнаружены близко расположенные две плазмидные ДНК размером около 54 т.п.н. (рис. 3). У штамма *Bacillus* sp. 2/5 плазмидные молекулы не визуализировались.

Тот факт, что практически все исследованные штаммы микробного сообщества нефтешлама оказались плазмидосодержащими, согласуется с известными литературными данными о преимущественном распространении плазмид в загрязнённых местообитаниях (Хоменков и др., 2008; Leahy, Colwell, 1990; Wallace, Saylor, 1992). Результаты, показавшие наличие сходной плазмидной молекулы у десяти штаммов р. *Corynebacterium*, выделенных из одного источника, могли свидетельствовать о существовании горизонтального переноса плазмиды в микробном сообществе нефтешлама.

Установлено, что под действием ингибирующего агента профлавина свойство деструкции нефтяных углеводов элиминировало с частотой от 1,3 до 5,0%, а свойство ацидотолерантности – с одинаковой частотой 12,5% у десяти кислотоустойчивых штаммов *Corynebacterium* spp., содержащих 45-50 т.п.н.-плазмидные ДНК. Плазмидный скрининг в 65 отобранных элиминантных клонах показал наличие корреляции между утратой плазмидной молекулы из штаммов и потерей свойства ацидотолерантности.

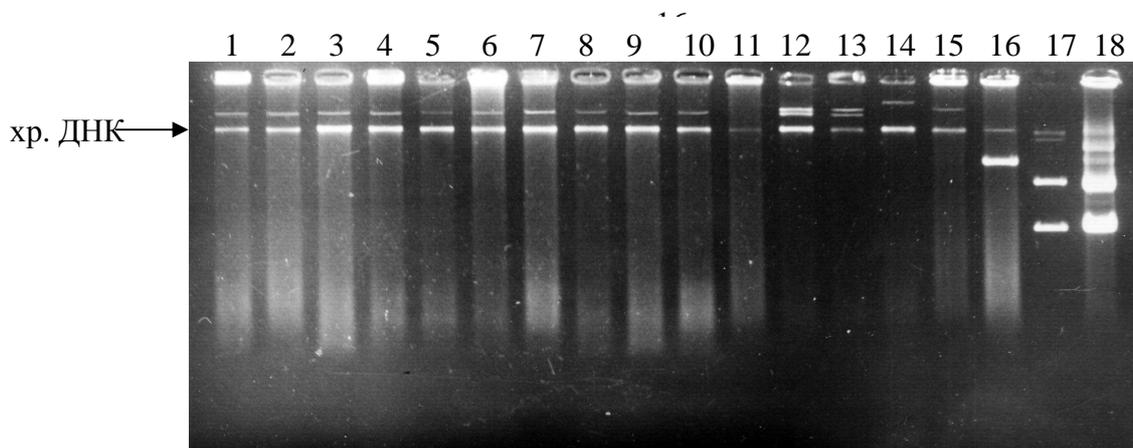


Рис. 3. Электрофореграмма плазмидной ДНК кислотоустойчивых нефтеокисляющих штаммов: 1 – *Corynebacterium* sp. УН1/1; 2 – *Corynebacterium* sp. УН1/2; 3 – *Corynebacterium* sp. УН2/1м; 4 – *Corynebacterium* sp. УН2/1к; 5 – *Corynebacterium* sp. УН2/2м; 6 – *Corynebacterium* sp. УН2/3м; 7 – *Corynebacterium* sp. УН3/1; 8 – *Corynebacterium* sp. УН3/2; 9 – *Corynebacterium* sp. УН4/1; 10 – *Corynebacterium* sp. УН4/4; 11 – *Bacillus* sp. УН2/5; 12 – *D. maris* УН1/3; 13 – *D. maris* АМ3; реперные плазмиды (т.п.н.): 14 – p90 (135); 15 – pSf1 (54); 16 – pММВ33 (13,75); 17,18 – pUC19 (2,7)

В связи с чем было высказано предположение о контроле функции ацидотолерантности у штаммов *Corynebacterium* spp. плазмидными генами. Было показано, что данные плазмидные молекулы стабильно наследуются при хранении содержащих их штаммов в подкисленной среде.

Были получены доказательства высокой стабильности 54 т.п.н.-плазмиды штамма *D. maris* АМ3 при его культивировании в неселективных условиях (до 10 пассажей на МПА), а также при длительном хранении (в течение пяти лет на агаризованной LB-среде) в музейной коллекции. Установлено, что под действием ДНК-тропного агента (налидиксовой кислоты) с частотой 14% возникали клоны *D. maris* АМ3 с редуцированной способностью к утилизации нефтяных углеводородов. Последующий скрининг плазмидных ДНК в отобранных элиминантных клонах показал отсутствие экстрахромосомных элементов в четырёх из них (рис. 4).

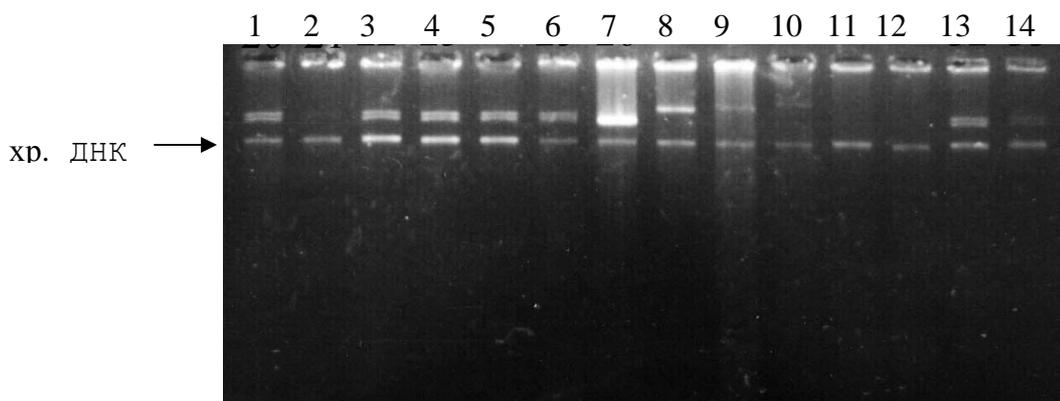


Рис. 4. Электрофореграмма плазмидной ДНК клонов штамма *D. maris* АМ3, частично утративших способность к деградации нефтяных углеводородов: 1 – исходный штамм *D. maris* АМ3; 2 – 15н; 3 – 17н; 4 – 21н; 5 – 23н; 6 – 31н; 11 – 34н; 12 – 44н; 13 – 46н; 14 – 47н; реперные плазмиды (т.п.н.): 7 – RP4 (39); 8 – R1 (93); 9 – R16 (103,5); 10 – R386 (117)

Морфологически эти клоны не отличались от исходного штамма *D. maris* AM3, формируя на МПА колонии с гладкой блестящей поверхностью и характерной яркой кораллово-красной окраской. Результат иммунодиффузионного анализа со специфическими антителами данного штамма показал, что углеводные антигены клеточной поверхности элиминантных клонов не претерпели каких-либо изменений и абсолютно идентичны данным структурам исходного штамма *D. maris* AM3. Степень деструкции гексадекана элиминантами составляла 53% и не отличалась от таковой у исходного штамма *D. maris* AM3. Оценка деструктивной активности данных элиминантов показала снижение способности к деструкции сырой нефти (в 2-5 раз), толуола (в 3-7 раз) и декалина (в 2-3 раза) по сравнению с исходным штаммом (рис. 5).

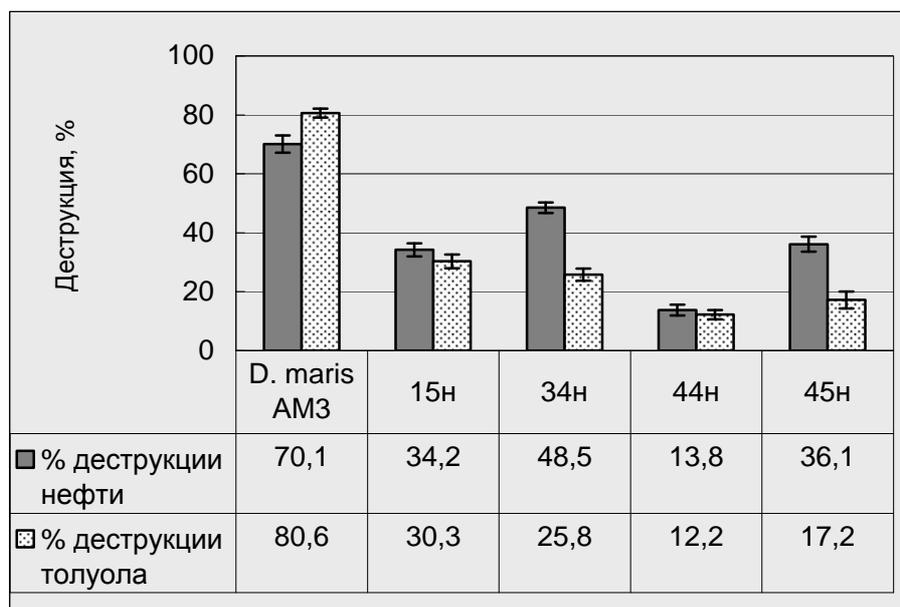


Рис. 5. Деструктивная активность элиминантных клонов *D. maris* AM3 по отношению к сырой нефти и толуолу (10 г/л) при культивировании в жидкой среде

На основании полученных данных о высокой частоте (14%) индуцированной элиминации свойства биodeградации углеводородов нефти, заметном снижении способности к деструкции нефти, толуола и декалина при утрате плазмидной ДНК штаммом *D. maris* AM3 высказано предположение об участии плазмидных генов в процессе биodeградации нефтяных углеводородов. Обладающая катаболическими генами клетка-хозяин имеет очевидное преимущество перед другими микроорганизмами, поскольку способность расщеплять поллютант является защитным механизмом и обеспечивает микроорганизм дополнительным источником углерода и энергии.

В ходе дальнейших исследований было обнаружено, что признак деструкции толуола с высокой частотой (10^{-3} - 10^{-5}) передавался от донорного штамма *D. maris* AM3 реципиентным бесплазмидным штаммам *Rhodococcus* sp. 261 и *R. terrae* A73 одновременно с переносом 54 т.п.н.-плазмиды. Показана принципиальная возможность передачи данной плазмиды с помощью трансформации в бесплазмидные клетки *D. maris* AM3. При оценке деструктивной активности

трансформантов по отношению к толуолу было показано, что степень деградации толуола составляла 75-78%, не отличаясь существенным образом от степени деградации у родительского штамма *D. maris* AM3. Результаты этих экспериментов явились доказательствами в пользу детерминации признака деструкции толуола генами, локализованными на 54 т.п.н.-плазмиде *D. maris* AM3.

Таким образом, полученные новые сведения о генетической регуляции свойств деградации нефтяных углеводородов и кислотолерантности у микроорганизмов – членов сообщества нефтешлама раскрывают механизмы, лежащие в основе устойчивого функционирования данного сообщества. Вероятно, под селективным давлением загрязнителя и факторов окружающей среды у микроорганизмов экспрессируются плазмидные гены, обеспечивающие преимущества штаммов при существовании в экстремальных условиях (такие как использование широкого круга субстратов и возможность расти в кислой среде). Наличие у штамма *D. maris* AM3 трансмиссивной катаболической плазмиды увеличивает метаболический потенциал аборигенного микробного сообщества и позволяет рассматривать данный штамм как источник распространения генетических элементов, ответственных за процессы разрушения углеводородов, что представляет перспективу для практического применения штамма.

5. ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ КИСЛОТОУСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ ДЛЯ РЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЁННОЙ ПОЧВЫ

Закономерности развития штамма *D. maris* AM3 при его интродукции в нефтезагрязнённую почву. В связи с вышеперечисленными физиологическими, биохимическими и генетическими преимуществами штамма *D. maris* AM3 исследовали возможность его использования для ремедиации нефтезагрязнённой почвы и грунта в лабораторных и микрополевым экспериментах (табл. 3).

При изучении экологической совместимости *D. maris* AM3 с естественной почвенной микрофлорой методом перекрёстных посевов и методом лунок не было обнаружено угнетения роста *D. maris* AM3, несмотря на его замедленное развитие (3-5 сут.) по сравнению со многими исследованными быстрорастущими бактериями. Было установлено таким образом, что штамм обладал высокой конкурентной способностью по отношению к микроорганизмам естественных почвенных сообществ.

Для идентификации и мониторинга штамма *D. maris* AM3, интродуцированного в почву, был успешно апробирован иммунохимический тест на основе полученных поликлональных кроличьих антител, специфичных к углеводным антигенам клеточной поверхности данного штамма. Отработана качественная реакция, включающая высев бактерий из очищаемой почвы на МПА (методом последовательных разведений), получение препаратов углеводных антигенов и исследование данных антигенов в тесте иммунодиффузии со специфическими антителами. Продемонстрировано, что данный тест позволяет быстро и однозначно идентифицировать интродуцированный в почву штамм *D. maris* AM3 (рис. 6А).

Условия проведения лабораторных и микрополевого экспериментов с использованием штамма *D. maris* AM3

	Эксперимент				
	Э1.1.	Э1.2.	Э1.3.	Э1.4.	Э2.
Почва	Чернозём южный	Тёмно-серая лесная почва	Чернозём южный*	Чернозём южный	Смешанный грунт с территории промышленных предприятий
Загрязнение	Сырая нефть, 20 г/кг почвы, свежее загрязнение				Многолетнее загрязнение нефтепродуктами, около 20 г/кг
Стимуляция, приёмы	Внесение азофоски – 0,7 г/кг и структуратора (древесные опилки) – 1/3 объёма почвы; регулярный полив и рыхление почвы	Регулярный полив и рыхление почвы	Внесение азофоски – 0,7 г/кг и структуратора (древесные опилки) – 1/3 объёма почвы; регулярный полив и рыхление почвы	Внесение азофоски – 0,7 г/кг; регулярный полив и рыхление почвы	Внесение азофоски – 0,7 г/кг, структуратора (древесные опилки) – 1/3 объёма почвы, неонла АФ9-12-С – 0,02 г/кг; регулярный полив и рыхление почвы
Аугментация, приёмы	Внесение <i>D. maris</i> AM3 (1×10^7 КОЕ/г почвы), азофоски – 0,7 г/кг, структуратора (древесные опилки) – 1/3 объёма почвы; регулярный полив и рыхление почвы	Внесение <i>D. maris</i> AM3 (1×10^7 КОЕ/г почвы)	Внесение <i>D. maris</i> AM3 (1×10^7 КОЕ/г почвы), азофоски – 0,7 г/кг, структуратора (древесные опилки) – 1/3 объёма почвы; регулярный полив и рыхление почвы	-	Внесение <i>D. maris</i> AM3 (1×10^7 КОЕ/г почвы), азофоски – 0,7 г/кг, структуратора (древесные опилки) – 1/3 объёма почвы; регулярный полив и рыхление почвы
Самоочищение	-	-	-	Регулярный полив	
Продолжительность эксперимента, сут.	90	30	30	60	90

Примечание. * – почва после эксперимента с растениями.

Установлено, что полученные антитела могут выявлять специфический антиген не только в составе препаратов, изолированных с бактериальной поверхности *D. maris* AM3, но также и в супернатанте его культуральной среды (рис. 6Б), что свидетельствовало о высокой экскреции данного антигена исследуемыми бактериями в окружающую среду.

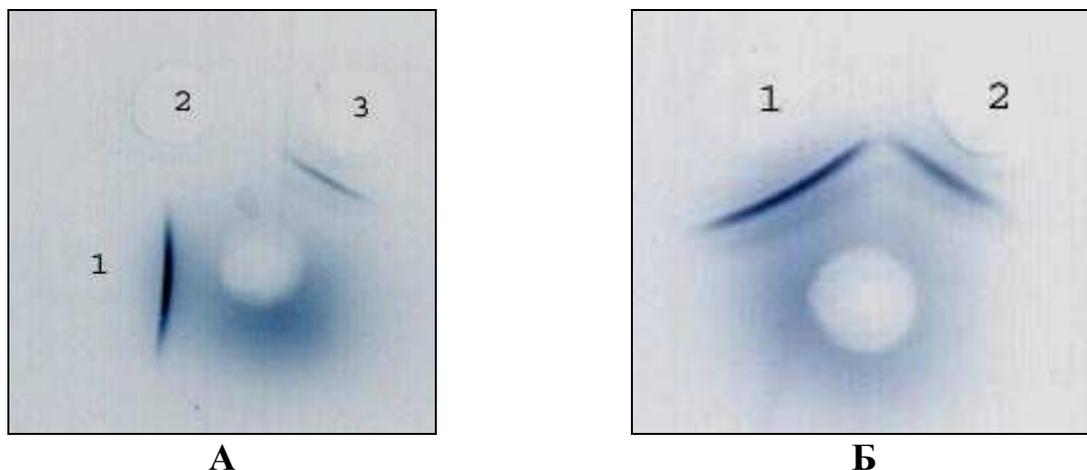
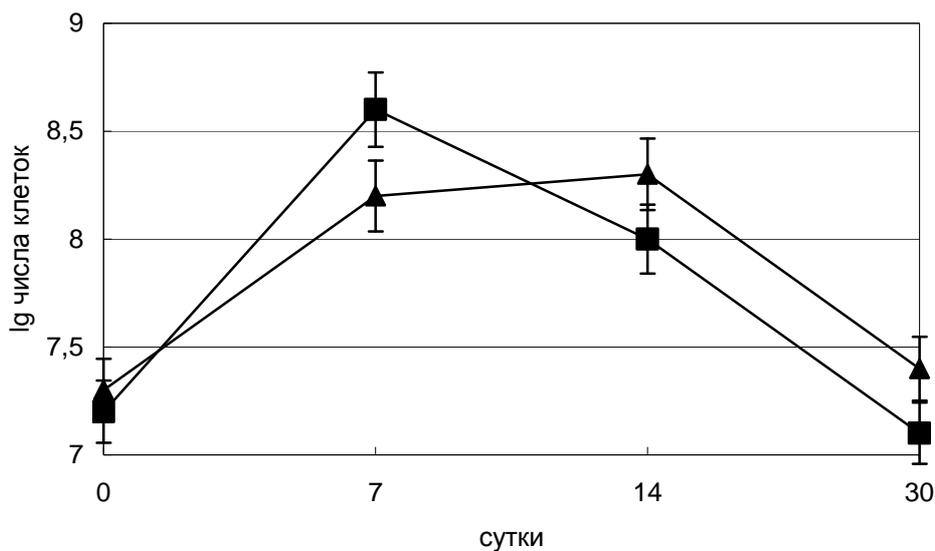


Рис. 6. Иммунодиффузионный анализ со специфическими антителами препаратов изолированных углеводных антигенов: (А) – 1 – *D. maris* AM3, 2 – бактериальных клеток, высеянных из нефтезагрязнённой почвы до интродукции *D. maris* AM3, 3 – после интродукции *D. maris* AM3; (Б) – 1 – с бактериальной поверхности *D. maris* AM3, 2 – из супернатанта культуральной среды *D. maris* AM3

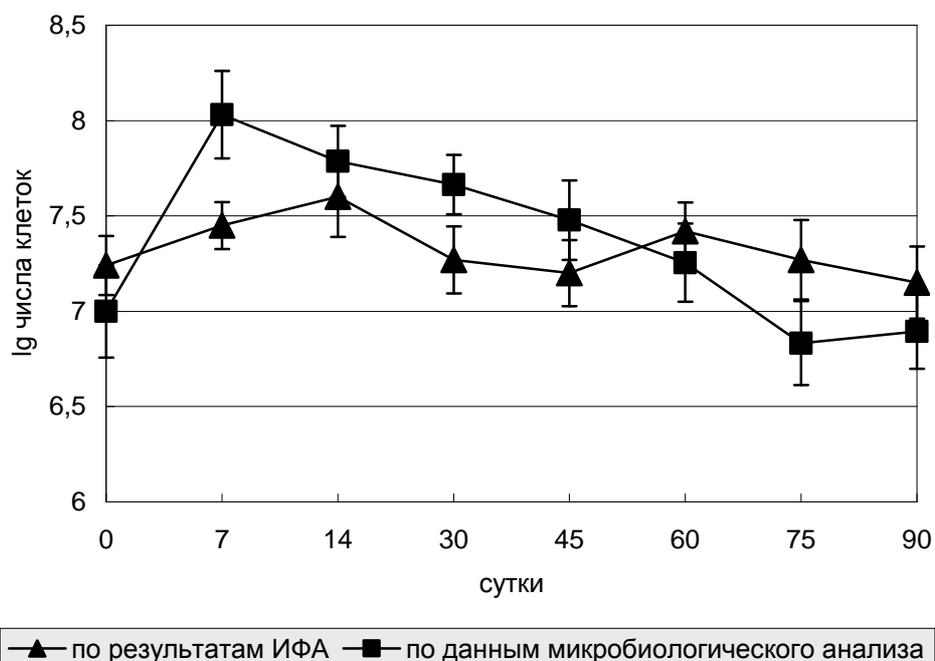
Этот факт создал предпосылки для разработки высокочувствительного теста на основе твёрдофазного ИФА, который сделал возможным выявление изучаемого штамма-деструктора непосредственно в почвенной суспензии, минуя стадию посева бактерий на питательную среду.

Динамику развития *D. maris* AM3 в чернозёме южном (эксперименты Э1.1. и Э1.3.), тёмно-серой лесной почве (Э1.2.) со свежим нефтяным загрязнением и смешанном грунте с многолетним загрязнением нефтепродуктами (Э2.) оценивали двумя способами: твёрдофазным ИФА и классическим микробиологическим методом подсчёта кораллово-красных колоний *D. maris* AM3 на МПА. Были обнаружены определённые закономерности развития штамма-интродуцента в разных почвенных сообществах (рис. 7). Максимальное развитие штамма во всех экспериментах наблюдалось через 7-14 сут., затем происходило снижение его численности до исходного уровня внесения.

Данные, полученные с помощью двух методов исследования численности *D. maris* AM3 (ИФА и микробиологический анализ), существенно образом коррелировали. При этом обнаружено, что максимальная численность штамма регистрировалась с помощью микробиологического анализа через 7 сут., а с помощью ИФА – через 14 сут., что, на наш взгляд, связано с периодом накопления специфического антигена в почве. Характерно, что во всех проведённых экспериментах титр *D. maris* AM3 до конца обработки сохранялся на достаточно высоком уровне (около 10^7 КОЕ/г почвы), что свидетельствовало о жизнеспособности данного интродуцента в различных загрязнённых почвах.



А



Б

Рис. 7. Корреляция между значениями численности штамма *D. maris* AM3 в чернозёме южном со свежим нефтяным загрязнением в эксперименте Э1.3. (А) и смешанном грунте с многолетним загрязнением нефтепродуктами в эксперименте Э2. (Б), полученными методом ИФА и с помощью микробиологического анализа

Лучше всего исследуемый штамм-интродуцент развивался в чернозёме южном со свежим нефтяным загрязнением (максимальное увеличение – в 373 раза через 14 сут. после внесения), что связано, скорее всего, со свойствами этой почвы, отличающейся высоким содержанием органических и минеральных элементов. Менее интенсивно штамм развивался в тёмно-серой лесной почве и чернозёме южном, используемом вторично после вегетационного эксперимента, увеличиваясь в численности в 6-26 раз.

Наименьшее развитие *D. maris* АМЗ наблюдалось в смешанном грунте с многолетним загрязнением нефтепродуктами (в 2-10 раз), что обусловлено рядом причин: физико-химическими и биологическими особенностями грунта, который менее питателен, чем почвы, разнообразием и сроком действия загрязнителей, что могло способствовать накоплению в нём токсичных метаболитов, образующихся при разложении углеводов, разнообразием аборигенных микробных сообществ, возникшим при смешивании различных грунтов и создающим для интродуцента жёсткие конкурентные условия и др.

В целом, наблюдаемая динамика специфического антигена *D. maris* АМЗ в почве, несомненно, отражала развитие штамма в процессе ремедиации и характеризовала направленность этого процесса, что позволяет рекомендовать метод ИФА для практического использования при проведении биоремедиационных работ для мониторинга интродуцированных микроорганизмов, что может существенно улучшить прогнозируемость хода и эффективности очистки.

Изучение реизолятов штамма *D. maris* АМЗ после культивирования на углеводородных субстратах. Исследование характеристик реизолятов нефтеокисляющего штамма *D. maris* АМЗ после культивирования на углеводородных субстратах, с одной стороны, представляло интерес с точки зрения появления у него новых свойств в результате возможных изменений в клеточной мембране, с другой – это было необходимо для подтверждения генетической и функциональной стабильности микроорганизма, предназначенного для очистки нефтезагрязнённых объектов. Были изучены реизоляты *D. maris* АМЗ после культивирования штамма в нефтезагрязнённой почве и грунте в течение трёх месяцев, а также в жидкой минеральной среде (рН 4,6 и 7,0) с гексадеканом (10 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии после культивирования в течение 14 сут.

Установлено, что после культивирования штамма на углеводородных субстратах увеличивается гидрофобность клеток (максимально на 15,5%). У ряда реизолятов обнаружена повышенная способность к деструкции индивидуального углеводорода гептадекана при рН 7,0 (на 5-22%), сырой нефти – максимум на 6% (рис. 8). Отмечена положительная корреляция между повышенными значениями деструктивной активности в отношении нефтяных углеводов и увеличенной гидрофобностью клеток. Обнаруженные изменения связаны, скорее всего, с увеличением содержания суммарных клеточных липидов и другими модификациями в гидрофобном липидном слое клеточной оболочки *D. maris* АМЗ и благоприятны для штамма, являющегося активным нефтеокисляющим микроорганизмом.

Дегидрогеназная активность у некоторых реизолятов была выше, чем у исходного штамма (максимально – на 17%). На основании изучения реизолятов выявлено повышение резистентности *D. maris* АМЗ к антибиотическим веществам после культивирования его на нефтяных углеводородах, что также связано с изменениями в клеточной оболочке бактерий. У реизолятов обнаружена высокая стабильность плазмидных молекул, эмульгирующей активности по отношению к нефти и способности к деструкции толуола. Результат иммунодиффузионного анализа со специфическими антителами данного штамма показал отсутствие изменений в углеводных антигенах клеточной поверхности реизолятов.

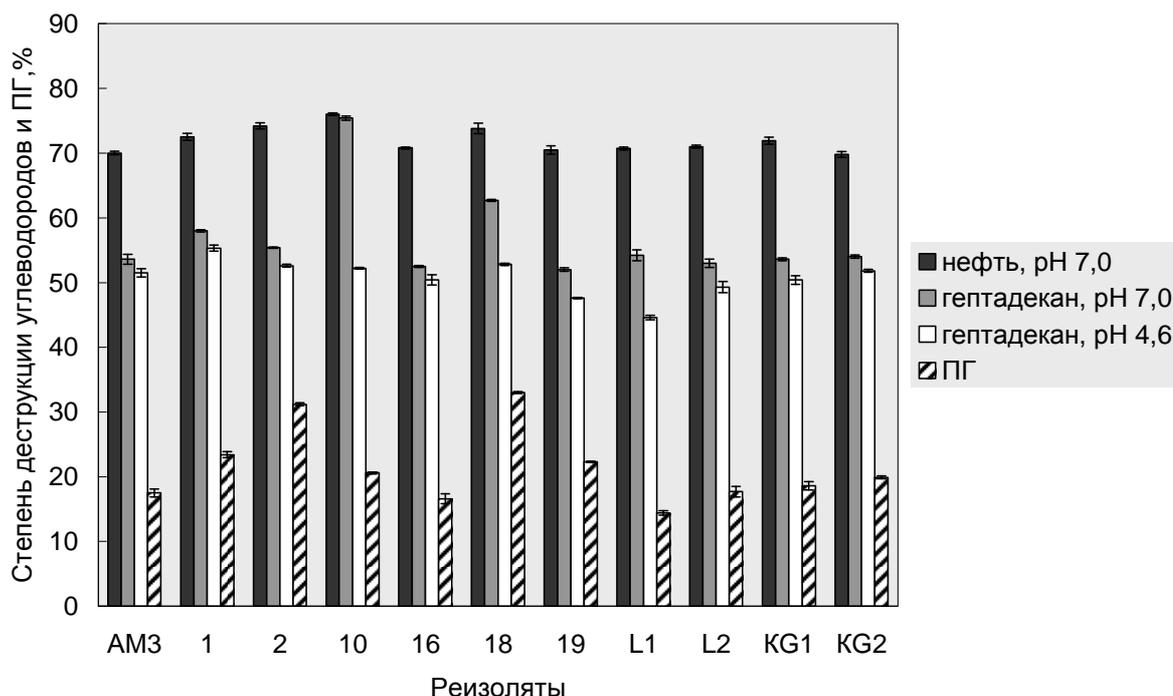


Рис. 8. Степень деструкции нефти, гептадекана (при pH 7,0 и 4,6) штаммом *D. maris* AM3 и его реизолятами и показатель гидрофобности (ПГ) бактериальных клеток

Выявленные особенности позволяют рассматривать штамм как эффективный и стабильный деструктор и свидетельствуют о перспективности длительного использования *D. maris* AM3 для биоремедиации нефтезагрязнённых почв.

Изучение процессов ремедиации нефтезагрязнённой почвы на основе интродукции штамма *Bacillus* sp. УН2/5. У штамма *Bacillus* sp. УН2/5, который был выбран по высоким показателям способности к деструкции сырой нефти в жидкой среде, была изучена нефтеокисляющая активность в почве. Данный микроорганизм, как было установлено, отличался высокой жизнеспособностью в нейтральной и кислой почве в условиях нефтяного загрязнения. Через 15 сут. численность данного штамма в кислой (pH 3,5) и нейтральной (pH 7,0) стерильной почве с нефтью была на уровне вносимой дозы: 5×10^7 КОЕ/г почвы, при пониженных значениях pH почвы – несколько выше, чем при нейтральных.

Увеличение численности *Bacillus* sp. УН2/5 в нефтезагрязнённом чернозёме южном без дополнительных стимулирующих мероприятий происходило примерно на порядок через 15 сут. после внесения, что сравнимо с ростом *D. maris* AM3 в чернозёме южном, используемом после вегетационного эксперимента, и смешанном грунте с многолетним нефтяным загрязнением при дополнительном внесении различных добавок.

Показано, что интродукция *Bacillus* sp. УН2/5 в почву способствовала более высокой численности ОГМ и УОМ (на 2 и 3 порядка), чем стимуляция естественного микробного сообщества путём внесения минерального удобрения, полива и рыхления почвы. Данный штамм обеспечивал высокую степень деградации нефти (49,5% за 15 сут.), которая в два раза превышала степень деградации при биостимуляции (24,3%). В целом, полученные данные свидетельствовали, что *Bacillus* sp. УН 2/5 не только

отличается высокой жизнеспособностью в кислой среде, но и способен к эффективной деструкции нефтяных углеводородов в кислой и нейтральной почве, что представляет практический интерес.

6. СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ САМООЧИЩЕНИЯ НЕФТЕЗАГРЯЗНЁННОЙ ПОЧВЫ И ТЕХНОЛОГИЙ БИОРЕМЕДИАЦИИ

Динамика развития микробных сообществ в нефтезагрязнённой почве в процессе самоочищения, стимуляции и аугментации на основе интродукции штамма *D. maris* АМЗ. Для того чтобы доказать преимущества использования той или иной технологии биоремедиации нефтезагрязнённой почвы, необходимо было выявить основные биологические факторы и механизмы, определяющие эффективность применения различных технологий. В первую очередь, определяли закономерности развития микробных почвенных сообществ при использовании биотехнологий очистки. Условия проведения экспериментов представлены в таблице 3.

В ходе экспериментов было установлено, что первый месяц после начала ремедиационных мероприятий загрязнённой почвы, а в большинстве случаев – это 7-14 суток – период наибольшего развития и аборигенной, и интродуцированной микрофлоры в почве (рис. 9 и 10). После максимального развития численность штамма-интродуцента *D. maris* АМЗ снижалась, численность ОГМ и УОМ также постепенно уменьшалась, что может быть связано с уменьшением концентрации органических субстратов в почве. Нами установлено, что на содержание УОМ и ОГМ влияла численность интродуцированного в почву штамма *D. maris* АМЗ, особенно в период его максимального развития (первый месяц ремедиации).

Доля интродуцированного штамма в популяции УОМ в почве со свежим загрязнением составляла на протяжении эксперимента 40-80%, на последнем этапе очистки – 70%, что свидетельствует о высокой выживаемости штамма *D. maris* АМЗ в нефтезагрязнённой почве. При оценке количества УОМ в образцах грунта с многолетним загрязнением подсчитывали колонии на мембранных фильтрах с нефтью (рис. 11). На рисунке хорошо видны ярко-окрашенные колонии штамма *D. maris* АМЗ в соответствующем варианте очистки через 3 сут. после интродукции.

Сравнивая динамику развития ОГМ и УОМ в разных почвах, необходимо отметить, что наибольшее развитие микроорганизмов происходило в чернозёме южном (эксперимент Э1.1.). При стимуляции, основанной на внесении удобрения совместно со структуратором, регулярном поливе и рыхлении почвы, численность ОГМ максимально увеличилась в 63 раза, УОМ – на три порядка через 7 сут., при аугментации численность ОГМ максимально увеличилась в 220 раз (рис. 9А), УОМ – на четыре порядка через 14 сут. (рис. 10Б). При аугментации численность ОГМ и УОМ в этой почве была выше, чем при стимуляции, на всём протяжении эксперимента.

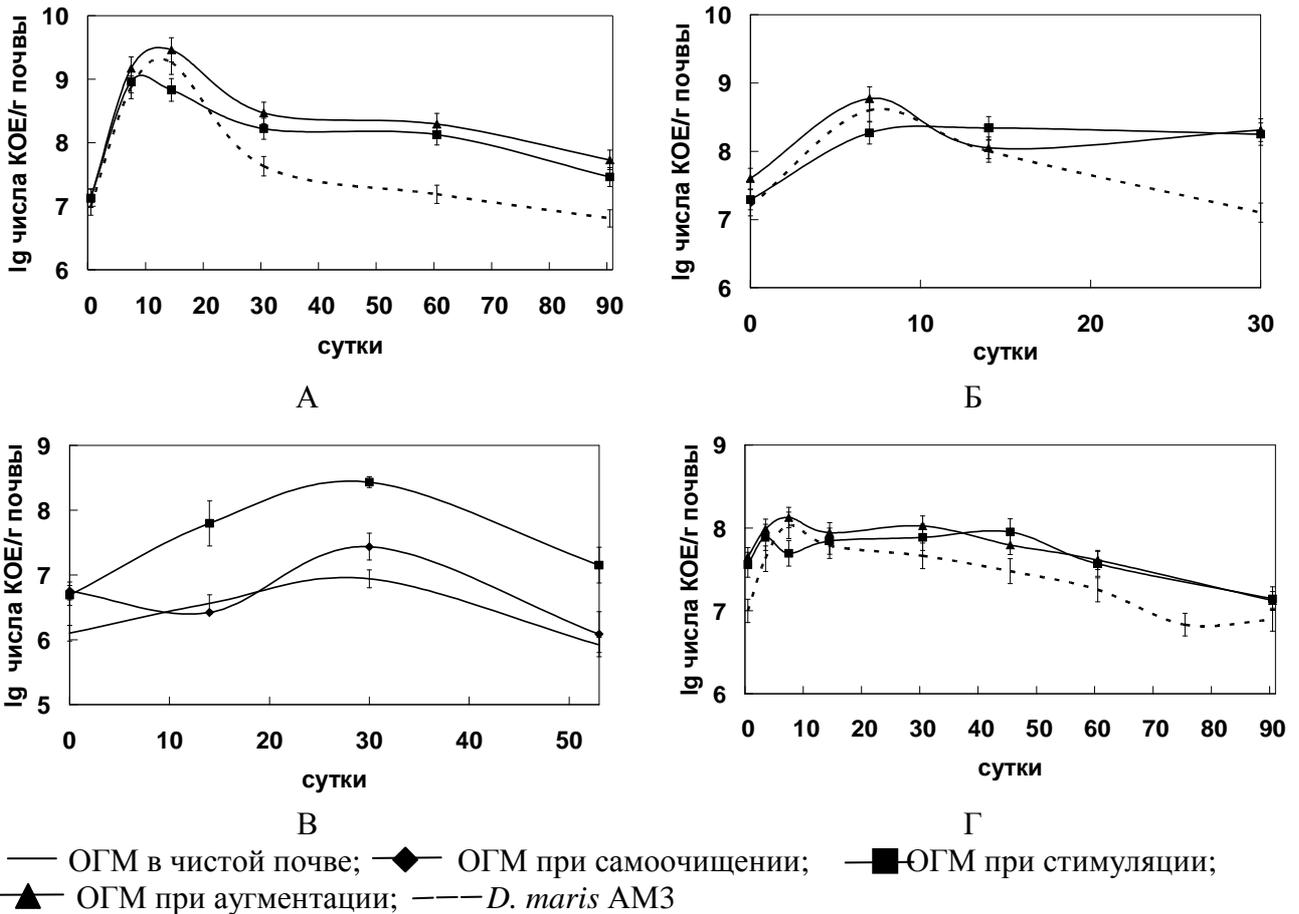


Рис. 9. Динамика численности ОГМ в процессе биоремедиации чернозёма южного со свежим нефтяным загрязнением в экспериментах: Э1.1. (А), Э1.3. (Б), Э1.4. (В) и смешанного грунта с многолетним загрязнением нефтепродуктами в эксперименте Э2. (Г)

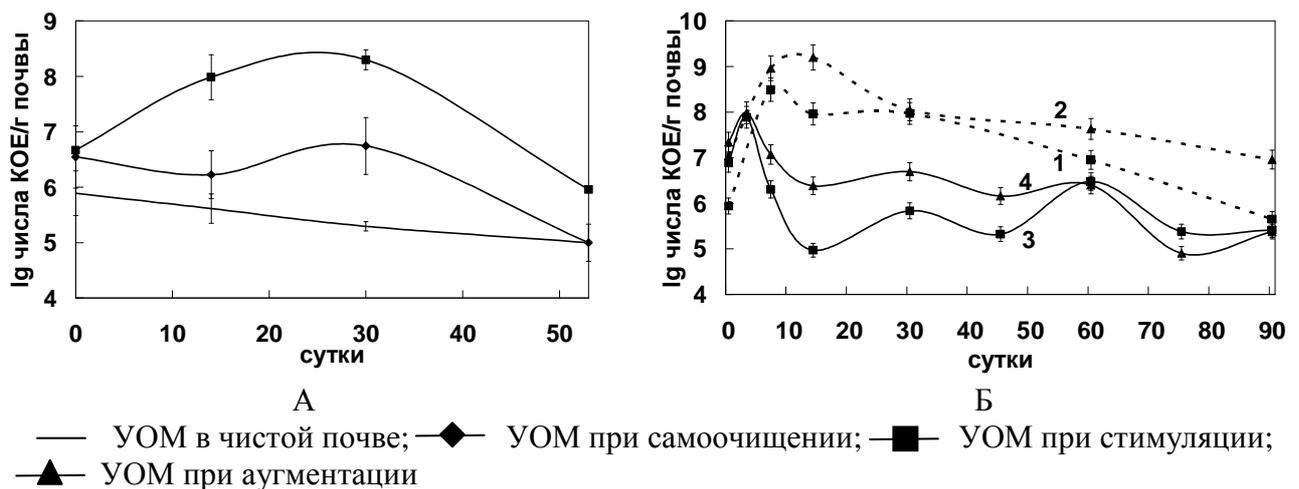
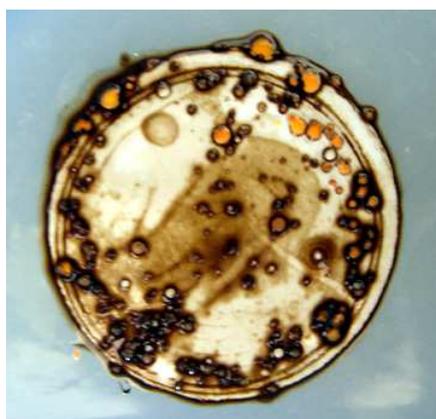


Рис. 10. Динамика численности УОМ в процессе биоремедиации чернозёма южного со свежим нефтяным загрязнением (А) в эксперименте Э1.4.; (Б): 1 – стимуляция, 2 – аугментация чернозёма южного со свежим нефтяным загрязнением в эксперименте Э1.1.; 3 – стимуляция, 4 – аугментация смешанного грунта с многолетним загрязнением нефтепродуктами в эксперименте Э2.



А

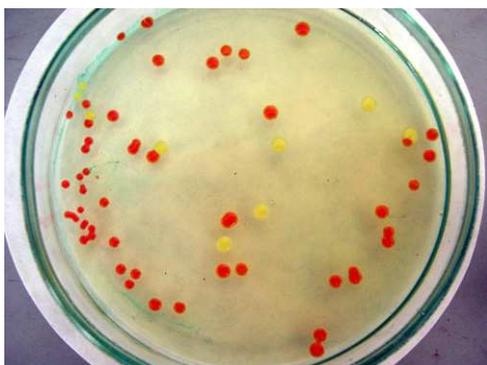


Б

Рис. 11. Колонии УОМ, обнаруживаемых в смешанном грунте с многолетним загрязнением нефтепродуктами через 3 сут. использования приёмов стимуляции (А) и аугментации (Б)

Внесение удобрения без структуратора способствовало меньшему развитию микроорганизмов в чернозёме южном (ОГМ и УОМ в 35 раз через 30 сут.) (рис. 9В и 10А), так же, как и использование стимуляции и аугментации в чернозёме южном, используемом после вегетационного эксперимента (ОГМ в 6 и 11 раз через 7 и 14 сут. соответственно) (рис. 9Б). Минимальное увеличение численности ОГМ и УОМ при стимуляции и аугментации происходило в смешанном грунте с многолетним загрязнением нефтепродуктами – в 2-2,5 и 8-10 раз (рис. 9Г и 10Б). Численность ОГМ в грунте при аугментации слегка превышала значения при стимуляции в период от 7 до 30 сут., численность УОМ при аугментации была выше, чем при стимуляции в период от 7 до 45 сут. Наиболее высокая численность УОМ в грунте в обоих вариантах обнаруживалась через 3 сут. ремедиации (рис. 10Б и 11).

Через 7 сут. после внесения в грунт *D. maris* AM3 доминировал над остальными членами микробного сообщества (рис. 12), через 90 сут. в очищаемом грунте обнаруживались в равном количестве колонии других микроорганизмов.



А



Б

Рис. 12. Микробные сообщества загрязнённого грунта, очищаемого с помощью интродукции штамма *D. maris* AM3 через 7 сут. (А) и 90 сут. (Б)

В этих условиях интродукция *D. maris* AM3 способствовала подавлению развития плесневых грибов в очищаемом грунте, которые обнаруживались через 75

сут., в отличие от грунта со стимулирующими приёмами, где плесневые грибы стали выявляться уже через 14 сут.

Таким образом, развитие ОГМ и УОМ в нефтезагрязнённой почве при использовании биотехнологий, как было показано, зависит от стимулирующих добавок, свойств почвы, типа и срока действия загрязнителя. Важно подчеркнуть, что при самоочищении нефтезагрязнённой почвы не происходило существенного увеличения содержания ОГМ и УОМ, что уменьшало потенциальную возможность микроорганизмов почвенного сообщества к быстрой утилизации загрязнителя.

В ходе исследований было продемонстрировано, что стимуляция естественной микрофлоры почвы путём внесения минерального удобрения, регулярного полива и рыхления почвы способствовала активизации процессов аммонификации, свидетельствующих об интенсификации процессов обмена азотсодержащих органических веществ, денитрификации, что предполагало возможное участие денитрификаторов в процессах биodeградации углеводов (рис. 13А и Б).

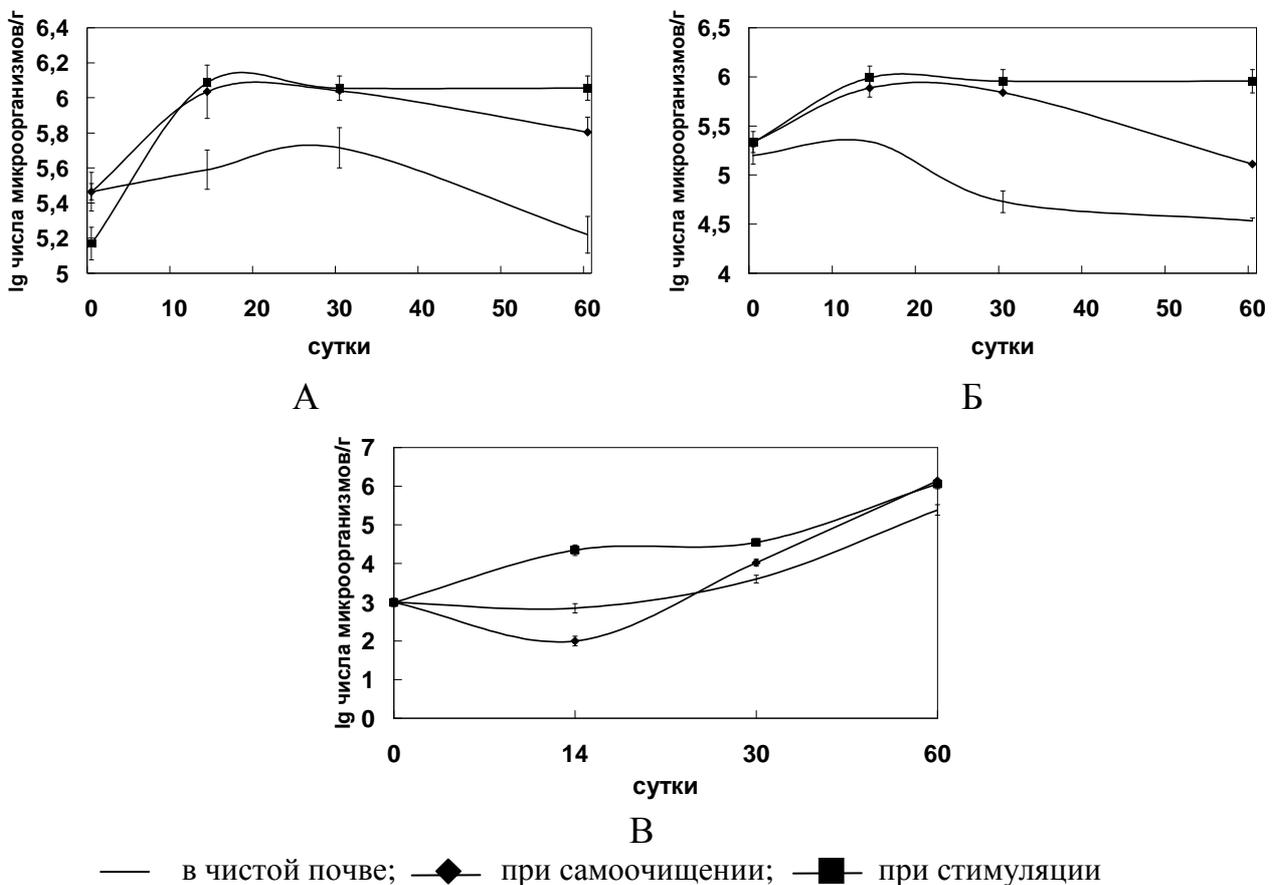


Рис. 13. Динамика численности аммонифицирующих (А), денитрифицирующих (Б) и нитрифицирующих (Б) микроорганизмов в нефтезагрязнённом чернозёме южном (эксперимент Э1.4.)

Происходила стимуляция численности нитрифицирующих микроорганизмов, которые среди других бактерий наиболее заметно ингибировались под воздействием нефтяного загрязнения (рис. 13В).

Численность аммонифицирующих, денитрифицирующих и нитрифицирующих микроорганизмов увеличилась примерно в 10 раз через 14 сут. и сохранялась на этом уровне до конца эксперимента. Функциональная стабильность как характерный пример самоорганизации и саморегулирования микробных сообществ обеспечивается

развитием в нефтезагрязнённой почве своеобразных «компенсационных» механизмов, соответствующих «тонкой настройкой» биоценоза на различных уровнях, изменением ритмики функционирования микробных сообществ. Примером развития таких «компенсационных» механизмов является резкое увеличение численности и активности микроорганизмов, принимающих участие в круговороте азота, несмотря на ингибирующее влияние нефтяных углеводов на функциональную активность почвенных ферментов.

Показатели численности микроорганизмов азотного цикла отражали интенсификацию очистки загрязнённой почвы при использовании технологии стимуляции по сравнению с естественным самоочищением и могли служить в качестве мониторинговых показателей биоремедиации.

Изменение показателей биологической активности почвы в процессе ремедиации. Оценка возможности использования этих показателей для мониторинга процессов очистки. При оценке функционального состояния микробиоценозов нефтезагрязнённых почв в процессах биоремедиации изучали динамику показателей биологической активности почвы. Показано увеличение интенсивности почвенной респирации, являющейся интегральным показателем общей биологической активности почвы (рис. 14).

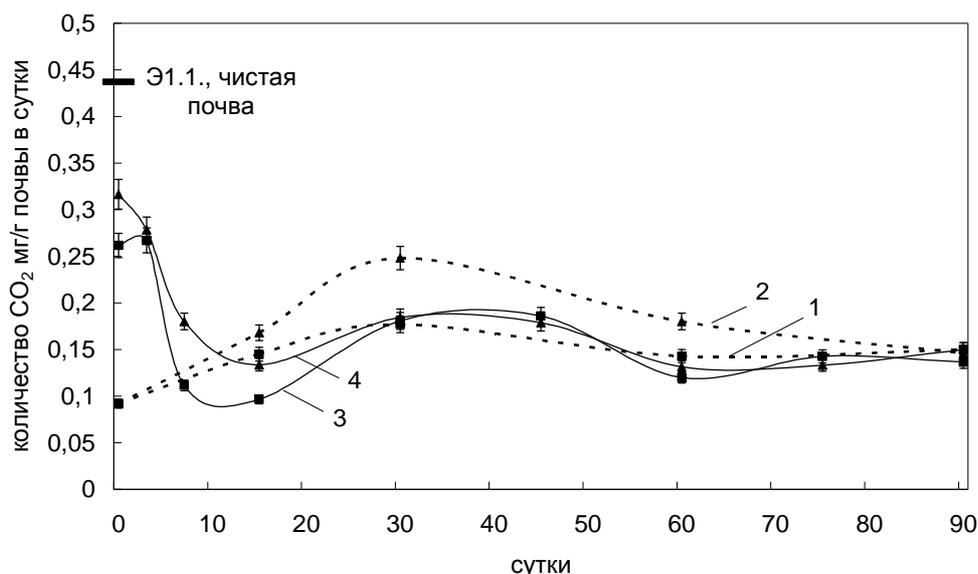


Рис. 14. Динамика почвенного дыхания в процессе ремедиации чернозёма южного (эксперимент Э1.1.): 1 – стимуляция, 2 – аугментация и смешанного грунта с многолетним загрязнением нефтепродуктами (эксперимент Э2.): 3 – стимуляция, 4 – аугментация

Максимальная интенсивность почвенной респирации и в чернозёме южном со свежим нефтяным загрязнением, и в смешанном грунте с многолетним загрязнением нефтепродуктами, наблюдалась к 30 суткам – периоду максимального развития микроорганизмов почвенного сообщества.

В этот период интродукция *D. maris* AM3 в чернозём южный способствовала повышению почвенной респирации в большей степени, чем стимулирующие приёмы, а в грунте с многолетним загрязнением данный показатель был выше в варианте с интродуцентом только на ранних этапах очистки (7-14 сут.).

Показатели активности ферментов в почве перспективны для мониторинга процессов очистки почв от различных загрязнителей, в связи с тем, что активность ферментов в почве определяется с высокой точностью, простотой и является устойчивым и чувствительным показателем биогенности почв. В настоящих экспериментах способы очистки, основанные на стимуляции природных микроорганизмов почвенного ценоза и интродукции нефтеокисляющего штамма *D. maris* AM3, приводили к увеличению активности дегидрогеназ в почве и грунте, особенно выраженному в первый месяц ремедиации, что связано с интенсивным развитием почвенных микроорганизмов, в том числе и УОМ, и высокой скоростью биodeградации нефтяных углеводородов в этот период (рис. 15).

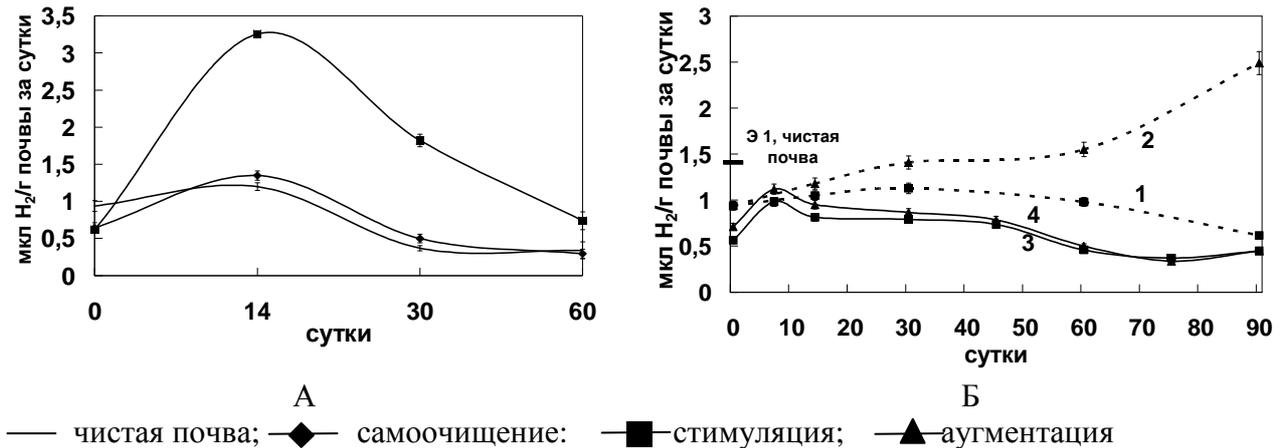
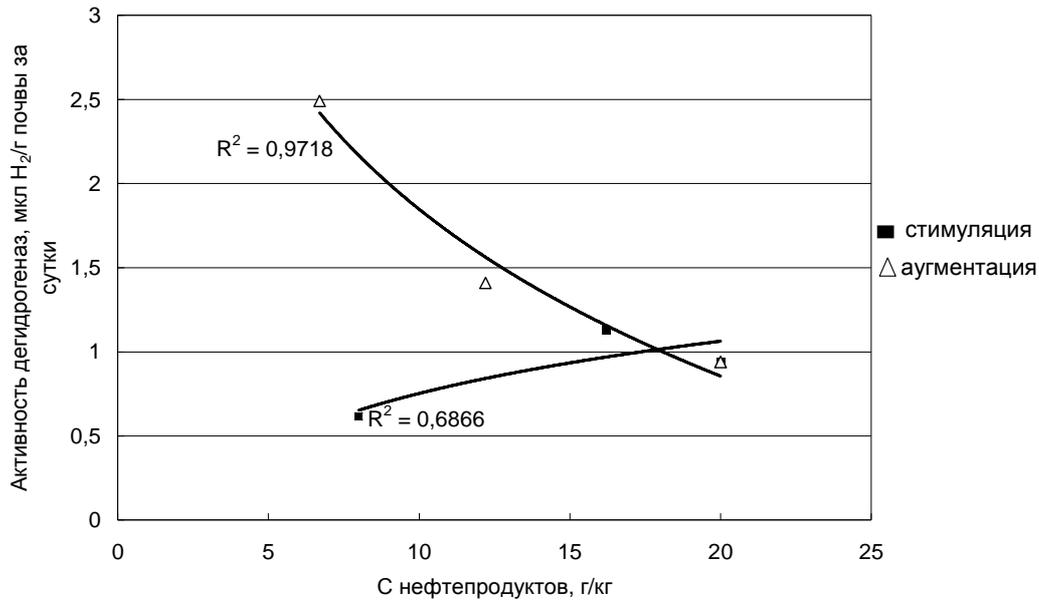


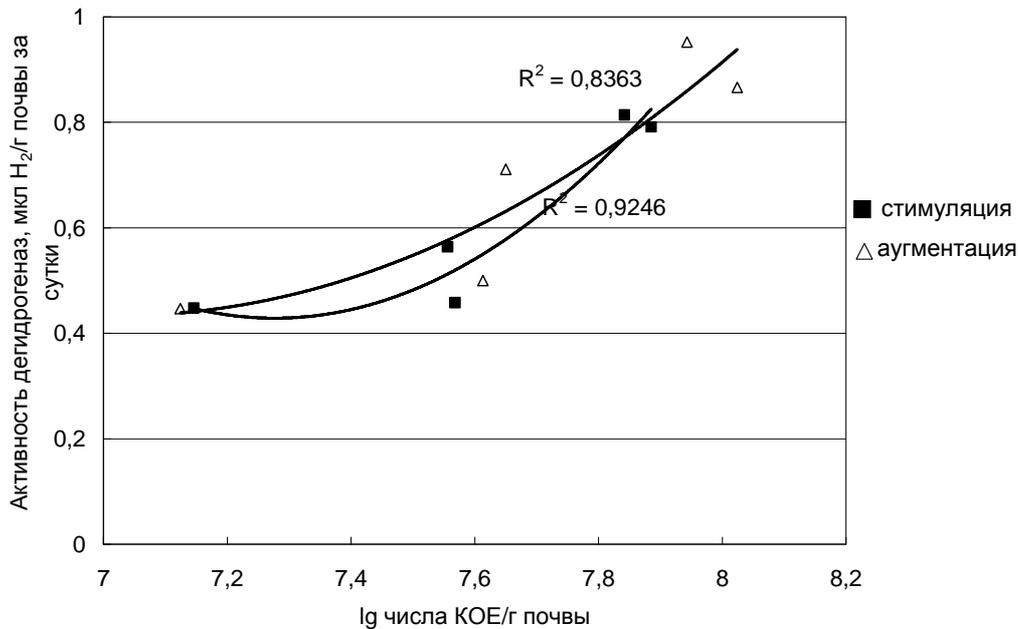
Рис. 15. Динамика активности дегидрогеназ в процессе биоремедиации чернозёма южного со свежим нефтяным загрязнением (А) в эксперименте Э1.4.; (Б): 1 – стимуляция, 2 – аугментация чернозёма южного со свежим нефтяным загрязнением в эксперименте Э1.1.; 3 – стимуляция, 4 – аугментация смешанного грунта с многолетним загрязнением нефтепродуктами в эксперименте Э2.

Дегидрогеназы катализируют реакции дегидрирования органических веществ и выполняют функцию промежуточных переносчиков водорода, таким образом, они принимают непосредственное участие в разложении углеводов. Поэтому увеличение активности дегидрогеназ в загрязнённой углеводородами почве напрямую связано с биodeградацией углеводов.

При этом интродукция штамма *D. maris* AM3 в нефтезагрязнённый чернозём южный способствовала большему увеличению активности дегидрогеназ через 30 сут. по сравнению со стимулирующими приёмами, через 90 сут. активность дегидрогеназ в этом варианте увеличилась ещё заметнее, в 4 раза превышая активность в почве при использовании стимуляции и в 2,6 раза в исходной чистой почве (рис. 15Б). В этом варианте очистки максимальные показатели дегидрогеназной активности почвы соответствовали минимальному остаточному содержанию нефтяных углеводородов (рис. 16А). При стимуляции аборигенных микроорганизмов в чернозёме южном, напротив, дегидрогеназная активность плавно снижалась вместе с убылью загрязнителя, что может быть связано с накоплением в почве продуктов деградации углеводов, оказывающих ингибирующий эффект на дегидрогеназы.



А



Б

Рис. 16. Зависимость дегидрогеназной активности от концентрации нефтепродуктов в чернозёме южном в эксперименте Э1.1. (А); от численности ОГМ в грунте с многолетним загрязнением нефтепродуктами (Б)

В грунте с многолетним загрязнением как при интродукции штамма *D. maris* AM3, так и при использовании стимулирующих приёмов наблюдалось одинаковое повышение дегидрогеназной активности, наиболее заметное – через 7 сут.: примерно в 1,7 раза. Обнаружены положительные корреляции между активностью дегидрогеназ и численностью ОГМ (стимуляция и аугментация в смешанном грунте с многолетним загрязнением нефтепродуктами) (рис. 16Б) и УОМ (стимуляция в чернозёме южном с помощью внесения удобрения, рыхления и полива почвы), что свидетельствовало о вкладе почвенной микрофлоры в общий пул почвенных дегидрогеназ. При самоочищении почвы от нефтяного загрязнения

повышения дегидрогеназной активности почвы не происходило, как и увеличения численности ОГМ и УОМ.

В ходе проведённых экспериментов было установлено, что при очистке почвы от нефтяных ингредиентов активность каталаз в почве увеличивалась, что связано, как мы полагаем, с активизацией аэробных процессов в ходе ремедиации. Данное предположение подтверждалось установленной обратной корреляционной зависимостью между активностью каталаз и остаточным содержанием нефтяных углеводов в почве. Высокоактивный кислород, образующийся при участии каталаз, обеспечивает доступным кислородом микроорганизмы, участвующие в процессах разложения углеводов.

В чернозёме южном при стимуляции естественной микрофлоры путём внесения удобрения, регулярного полива и рыхления почвы, активность каталаз в период 14-60 сут. значительно возрастала, превышая значения в почве при самоочищении примерно в 4 раза (рис. 17А).

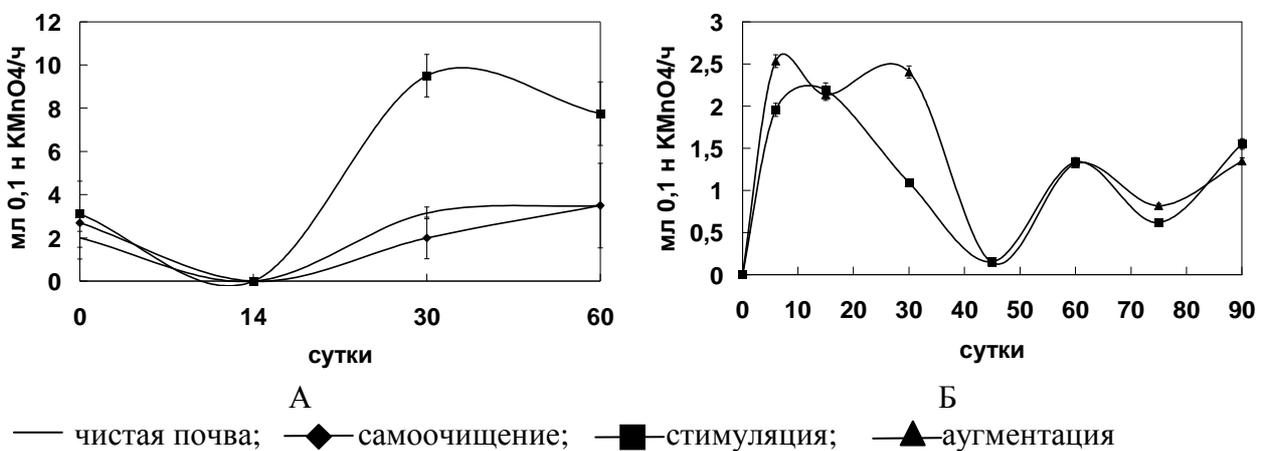


Рис. 17. Динамика активности каталаз в процессе биоремедиации чернозёма южного со свежим нефтяным загрязнением в эксперименте Э1.4. (А) и смешанного грунта с многолетним загрязнением нефтепродуктами в эксперименте Э2. (Б)

Повышенная активность каталаз в почве при использовании технологии стимуляции по сравнению с самоочищением может свидетельствовать о более интенсивной очистке почвы от нефтяных углеводов и служить критерием, характеризующим процесс ремедиации.

Наблюдалась более выраженная активность каталаз в нефтезагрязнённом чернозёме южном с интродуцированным штаммом по сравнению со стимуляцией в конце очистки (эксперимент Э1.1.) и в грунте с многолетним загрязнением в период 7 и 30 сут. (рис. 17Б), что может свидетельствовать о преимуществах использования штамма-интродуцента *D. maris* AM3 для ремедиации нефтезагрязнённой почвы.

Показано увеличение липазной активности в почве со свежим нефтяным загрязнением и грунте с многолетним загрязнением с ходом ремедиации, максимальные значения активности липаз наблюдались на последних этапах очистки (рис. 18). Такой результат связан, по нашему мнению, с индукцией активности почвенных липаз продуктами распада нефтяных углеводов, увеличением метаболической активности и биомассы микроорганизмов, утилизирующих липиды,

и возможным накоплением в почве с ходом очистки липидоподобных веществ биологического и химического происхождения, являющихся субстратами для липаз. Установлено, что технология стимуляции способствует большей активизации липаз по сравнению с самоочищением, а технология аугментации ещё большей активизации как в почве, так и в грунте.

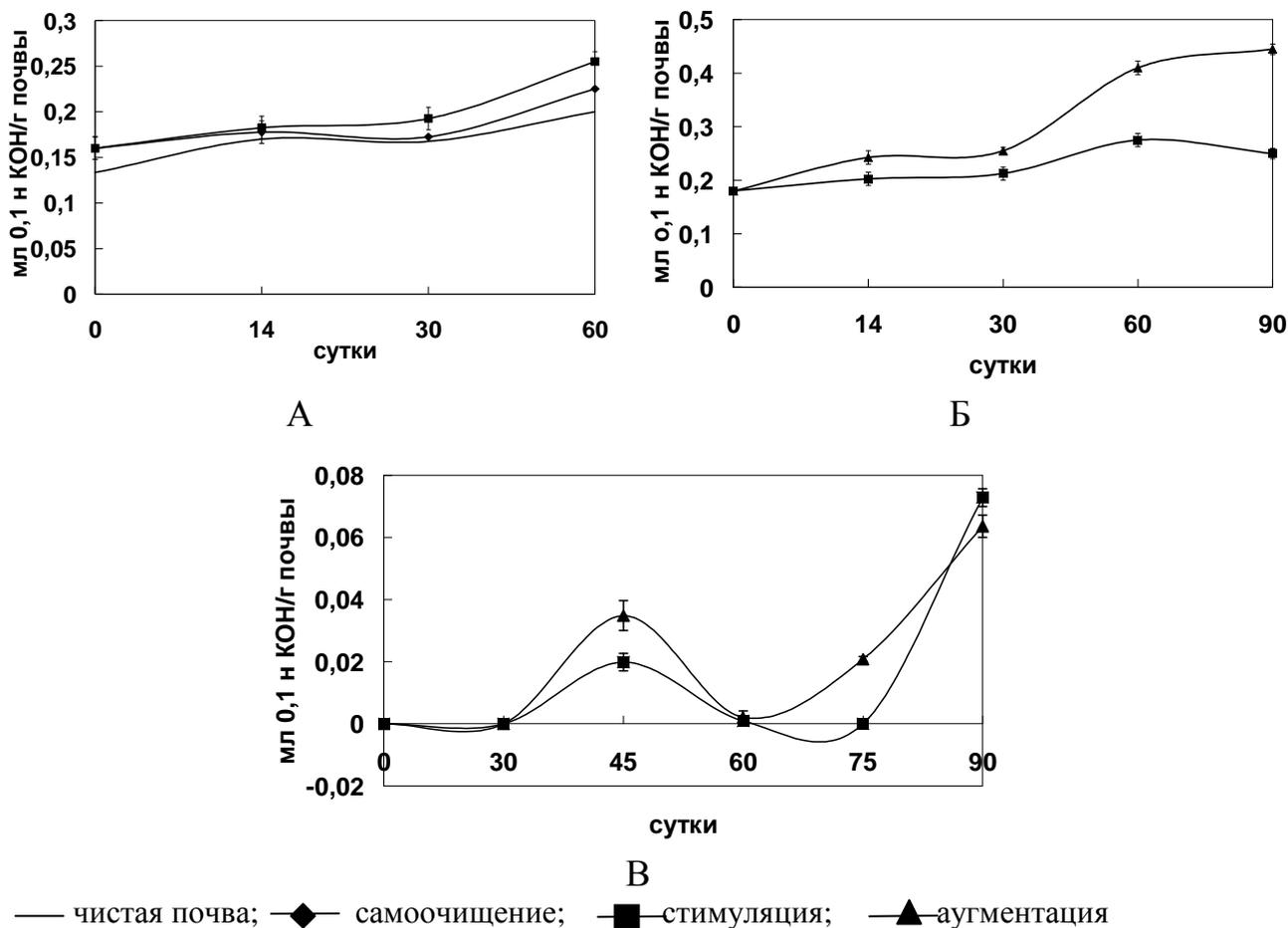


Рис. 18. Динамика активности липаз в процессе биоремедиации чернозёма южного со свежим нефтяным загрязнением в эксперименте Э1.4. (А), эксперименте Э1.1. (Б) и смешанного грунта с многолетним загрязнением нефтепродуктами в эксперименте Э2. (В)

В чернозёме южном со свежим нефтяным загрязнением наибольших значений липазная активность достигала в образце с добавлением штамма *D. maris* AM3 в течение всего периода наблюдений, в смешанном грунте с многолетним загрязнением нефтепродуктами – на определённых этапах очистки (45 и 75 сут.). При этом максимальному уровню очистки соответствовала максимальная интенсификация активности липаз в почве, что позволяет рассматривать данную ферментативную активность как перспективный показатель мониторинга процессов биоремедиации нефтезагрязнённой почвы.

Активность уреаз в чернозёме южном со свежим нефтяным загрязнением (эксперимент Э1.4.) возрастала через 30 и 60 сут. при стимуляции аборигенной микрофлоры путём внесения удобрения, регулярного полива и рыхления почвы в 1,4 и 4 раза по сравнению с исходной почвой, превышая показатели при самоочищении в 1,2 и 3 раза соответственно (рис. 19).

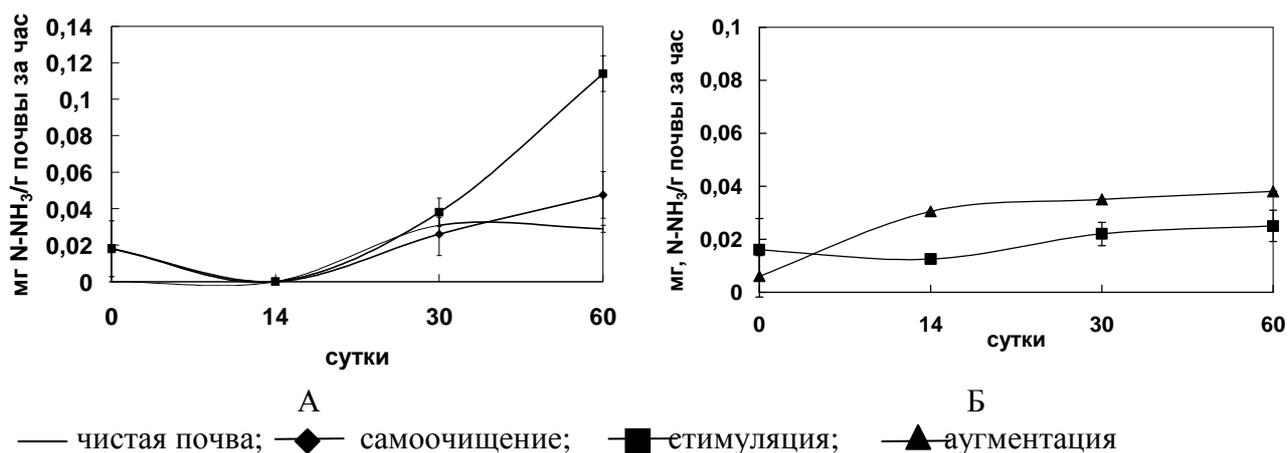


Рис. 19. Динамика активности уреаз в процессе биоремедиации чернозёма южного со свежим нефтяным загрязнением в эксперименте Э1.4. (А) и Э1.1. (Б)

Повышенный уровень активности уреаз при использовании технологии стимуляции может свидетельствовать о более высокой интенсивности гидролитических процессов в очищаемой почве и, следовательно, о биodeградационных процессах, что совпадало с повышенной степенью деструкции нефтяных углеводородов в этом варианте. В то же время, высокие уровни активности уреазы не всегда благоприятны, т.к. приводят к значительным потерям азота мочевины (Девятова, 2005), что отрицательно сказывается на азотном балансе почвы. В чернозёме южном со штаммом-интродуцентом (эксперимент Э1.1.) активность уреаз была примерно в 1,4 раза выше в период 14-60 сут., чем при стимуляции естественной микрофлоры путём внесения удобрения со структуратором, регулярного полива и рыхления почвы.

В целом, в вариантах очистки с максимальной активностью дегидрогеназ, каталаз, липаз и уреаз в почве наблюдалось максимальное увеличение численности ОГМ и УОМ по сравнению с другими вариантами и максимальная степень деградации нефтяных углеводородов. При самоочищении почвы дегидрогеназная, каталазная, липазная и уреазная активности в ней не увеличивались. Таким образом, динамика исследованных показателей биологической активности нефтезагрязнённой почвы и грунта отражала характер процессов очистки, выявляла преимущества различных технологий ремедиации, что даёт возможность использовать эти показатели для мониторинга процессов очистки почв от углеводородных загрязнителей.

Оценка токсичности почвы после ремедиации. В ходе фитотестирования чернозёма южного (эксперимент Э1.1.) показано, что на основании всхожести семян и средней длины корня проростков редиса почва после ремедиации была нетоксичной, по результатам средней длины ростка редиса – слаботоксичной, по всем показателям проростков пшеницы фитотоксичность почвы оценивалась как средняя (табл. 4). В присутствии штамма-интродуцента средняя длина корня проростков редиса была на 26,6% выше, чем при стимуляции.

Фитотестирование почвы на проростках пшеницы и редиса

Тестовое растение	Варианты эксперимента	Длительность эксперимента, сут.	Показатель					
			Всхожесть		Средняя длина корня		Средняя длина ростка	
			%	% от контроля	мм	% от контроля	мм	% от контроля
Эксперимент Э1.1.								
Пшеница сорта «Саратовская 29»	контроль, чистая почва		92,5±2,24	100	119,1±3,11	100	20,8±0,45	100
	стимуляция	0	80,0±1,83	86,5±2,33	46,2±0,82	38,8±0,92	4,1±0,13	19,7±0,53
		90	82,5±2,65	89,2±2,12	70,3±1,27	59,0±0,57	12,7±0,33	61,1±0,83
	аугментация	0	80,0±1,83	86,5±2,33	46,2±0,82	38,8±0,92	4,1±0,13	19,7±0,53
90		86,6±2,23	93,6±2,93	73,4±1,56	61,3±2,06	11,3±0,41	54,3±1,21	
Редис сорта «Заря»	контроль, чистая почва		95,0±2,75	100	40,2±1,07	100	27,4±0,49	100
	стимуляция	0	85,0±3,04	89,5±3,23	11,6±0,32	28,9±0,52	4,0±0,18	14,2±0,76
		90	98,3±2,77	103,5±3,46	36,5±0,94	90,8±2,04	17,8±0,73	65,0±1,53
	аугментация	0	85,0±3,04	89,5±3,23	11,6±0,32	28,9±0,52	4,0±0,18	14,2±0,76
90		95,8±3,05	100,8±3,45	47,2±1,24	117,4±3,10	17,6±0,84	64,2±1,44	
Эксперимент Э2.								
Пшеница сорта «Саратовская 29»	контроль, чистая почва		95,0±1,97	100	138,5±2,78	100	34,05±1,22	100
	стимуляция	0	90,0±1,58	94,7±2,58	100,6±2,42	72,6±2,24	17,9±1,96	52,5±1,62
		90	86,7±2,88	91,2±3,11	92,8±2,56	67,0±2,18	13,1±0,63	38,3±0,76
	аугментация	0	83,3±3,36	87,7±3,41	72,9±1,95	52,6±0,86	12,0±0,38	35,2±1,20
90		85,0±1,86	89,5±1,98	85,3±2,29	61,6±0,76	12,4±0,88	36,3±1,41	
Редис сорта «Заря»	контроль, чистая почва		82,5±2,57	100	24,9±1,05	100	16,3±0,56	100
	стимуляция	0	88,3±3,54	107,1±3,06	40,7±3,31	163,3±3,77	7,4±0,20	45,5±0,60
		90	91,6±3,77	111,0±3,13	38,7±2,62	155,4±3,15	8,0±0,41	49,4±0,81
	аугментация	0	83,3±3,35	101,0±3,89	40,1±1,56	160,9±3,06	7,6±0,38	46,9±0,56
90		100,0±3,70	121,2±3,89	49,2±1,29	197,4±3,18	7,4±1,04	45,3±1,04	

Оценка токсичности почвы с помощью фитотестирования на проростках редиса и по дегидрогеназной активности штамма *D. maris* AM3 (эксперимент Э1.4.)

Варианты эксперимента	Длительность эксперимента, сут.	Показатель							
		Всхожесть семян		Средняя длина корня		Средняя длина ростка		Содержание ТФФ	
		%	% от контроля	мм	% от контроля	мм	% от контроля	мкг/мл	% от контроля
Контроль, чистая почва		92,5±3,76	100	29,5±1,87	100	25,3±2,41	100	222,0±3,28	100
Самоочищение	0	87,5±2,89	94,6±2,96	26,4±2,89	89,4±2,97	20,8±1,49	82,2±2,02	60,1±1,18	27,1±1,54
	30	84,3±2,44	91,1±2,48	31,2±2,42	105,7±2,76	15,5±1,12	61,2±2,11	55,5±1,01	25,0±1,34
	60	109,6±2,35	101,4±2,58	30,2±1,48	102,1±3,09	36,2±1,95	142,9±2,97	24,4±0,29	11,0±0,41
Стимуляция	0	79,5±2,45	86,0±2,63	25,13±2,93	85,2±2,96	20,3±0,49	80,2±2,54	60,1±1,18	27,1±1,54
	30	80,3±2,65	86,8±2,76	32,0±1,95	108,6±3,08	12,2±0,45	48,2±1,37	83,3±1,18	37,5±1,92
	60	85,3±2,91	92,2±2,95	31,9±0,97	108,3±2,98	42,2±1,49	166,7±3,07	40,6±1,31	18,3±1,40

После очистки смешанного грунта с многолетним загрязнением нефтепродуктами стимуляцией естественного микробного сообщества токсичность почвы по отношению к пшенице несколько увеличилась, по отношению к редису не изменилась, сохранялось угнетённое развитие надземной части проростков (табл. 4). При внесении штамма *D. maris* AM3 наблюдалась тенденция к снижению токсичности, что, на наш взгляд, связано с подавлением данным штаммом патогенных микромицетов в почве, которые, как известно (Киреева и др., 2005; Назаров, Иларионов, 2005), увеличиваются в численности при нефтяном загрязнении и определяют фитотоксичность нефтезагрязнённой почвы. Данное предположение подтверждалось микробиологическим анализом – плесневые грибы при этом способе обработки появились значительно позже и в меньшем количестве.

Было установлено, что через 60 сут. очистки чернозём южный (эксперимент Э1.4.) по всем изученным показателям был нетоксичным для проростков редиса (табл. 5). При стимуляции естественного микробного сообщества путём внесения удобрения, полива и рыхления почвы токсичность почвы была ниже по показателю средней длины корня и роста проростка редиса, чем при самоочищении.

В ходе исследований нами был разработан метод определения токсичности нефтезагрязнённой почвы после биоремедиации по дегидрогеназной активности бактерий. Дегидрогеназы высоко чувствительны к действию ядовитых веществ, в присутствии которых их активность снижается, что позволило нам путём сравнения количества ТФФ, образованного дегидрогеназами микробного штамма *D. maris* AM3, в опытах и контроле оценить степень токсичности исследуемых образцов почвы. Следует отметить, что разработанный и апробированный нами метод биотестирования прост, хорошо воспроизводим, обеспечивает получение точных и стабильных результатов. Для анализа используются непосредственно образцы почвы, а не почвенная вытяжка, как в методах на основе гидробионтов (инфузорий, дафний и др.), что позволяет наиболее достоверно оценить токсичность почвы. Метод обладает высокой чувствительностью, он позволяет регистрировать возможность образования в почве опасных метаболитов токсикантов.

При оценке токсичности нефтезагрязнённого чернозёма южного (эксперименты Э1.1. и Э1.4.) по дегидрогеназной активности тест-организма *D. maris* AM3 наблюдались тенденции, обнаруженные при фитотестировании: через 30 сут. ремедиации показана средняя степень токсичности почвы (табл. 5). Установлено, что очистка почвы, основанная на стимуляции аборигенной микрофлоры, способствует снижению токсичности почвы в большей степени, чем процесс самоочищения, а использование штамма-интродуцента снижает токсичность почвы сильнее, чем стимулирующие приёмы, через 30 сут., т.е. в период максимального развития и активности почвенных микроорганизмов. В конце очистки в обоих экспериментах обнаруживались различия между двумя способами оценки токсичности почвы: почва оказалась не токсичной для растений, но ещё токсичной для микробных ферментов, что свидетельствует о необходимости использования нескольких оптимальных биотестов для достоверной оценки токсичности почвы после биоремедиации.

Изменение содержания нефтяных углеводородов и ряда агрохимических показателей в ходе ремедиации. Эксперименты показали, что первый месяц после начала ремедиационных мероприятий загрязнённой почвы характеризовался максимальным развитием аборигенной и интродуцированной микрофлоры в почве, активностью дегидрогеназ в почве и максимальной скоростью деструкции нефтяных углеводородов.

В ходе экспериментов было установлено, что при стимуляции естественного почвенного сообщества внесением минерального удобрения совместно с регулярным поливом и рыхлением почвы (эксперимент Э1.4.) убыль общих нефтяных

углеводородов в чернозёме южном в ходе очистки была выше на 13-15%, чем при самоочищении. В случае свежего нефтяного загрязнения чернозёма южного (эксперимент Э1.1.) интродукция *D. maris* AM3 способствовала убыли общих нефтяных углеводородов на 39% в почве за 30 сут., что было в два раза выше степени их разложения аборигенным микробным сообществом при стимуляции путём внесения удобрения со структуратором, регулярного полива и рыхления почвы, которая составила 19% за данный период (рис. 20). Значительная разница в убыли нефти свидетельствовала о высокой активности интродуцированного штамма в течение первого месяца очистки. Через 90 сут. эта разница исчезла. Разрушение нефтяных углеводородов в почве при внесении штамма достигла 66, а при стимуляции – 60%.

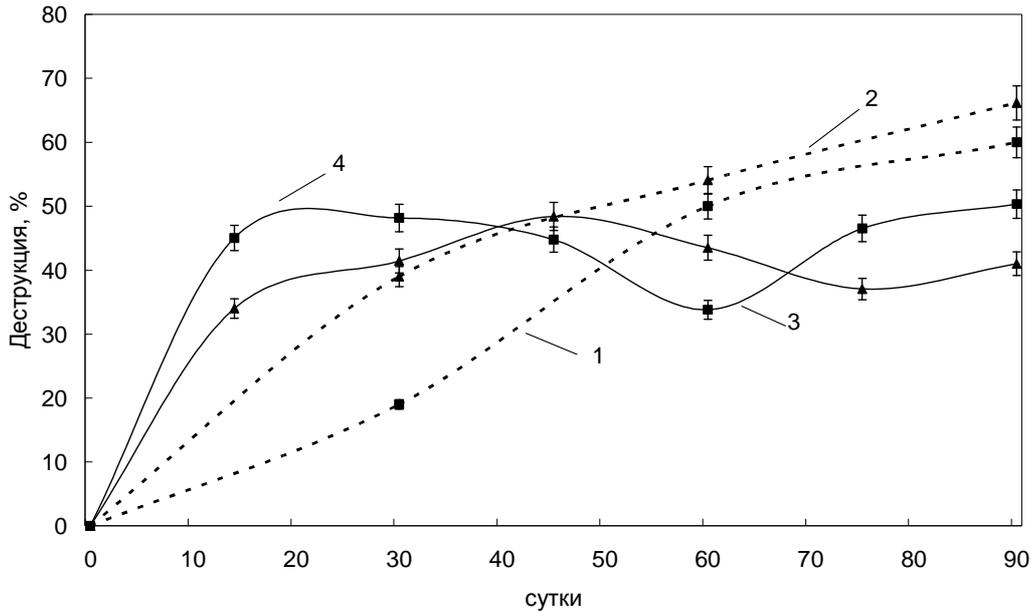


Рис. 20. Степень деструкции общих нефтяных углеводородов в эксперименте Э1.1. (1 – стимуляция, 2 – аугментация) и Э2. (3 – стимуляция, 4 – аугментация)

В смешанном грунте с многолетним загрязнением нефтепродуктами степень его очистки при внесении нефтеокисляющего штамма AM3 была даже несколько ниже в первый месяц, чем при биостимуляции, и сходные результаты наблюдались через 3 мес. очистки (50 и 48% в почве при стимуляции и аугментации соответственно). При ремедиации грунта происходило некоторое увеличение концентрации нефтепродуктов, наблюдаемое в период от 30 до 60 сут. в варианте с использованием стимуляции и от 45 до 75 сут. в варианте с интродукцией штамма, что можно объяснить снижением связывания загрязнителя с грунтом за счёт процессов, происходящих при ремедиации (Maila, Cloete, 2005), кроме того, под воздействием температуры, влажности и механической обработки разрушились агрегаты с высоким содержанием твёрдых нефтепродуктов, что можно было наблюдать визуально.

В условиях свежего загрязнения нефтью аборигенной микрофлоре необходимо время для адаптации к загрязнителю, поэтому, на наш взгляд, внесение активного штамма-деструктора ускоряло процесс очистки в первый месяц. Многолетнее загрязнение, выступающее в роли селекционирующего фактора для УОМ, создало повышенный деструктивный потенциал микробных сообществ, который реализовался при использовании оптимального комплекса стимулирующих мероприятий.

Показано, что как при свежем нефтяном загрязнении почвы, так и многолетнем загрязнении грунта, убыль нефтепродуктов происходила в основном за счёт разложения парафино-нафтеновых углеводородов, через 90 сут. степень их

деградации составляла 53-58%, существенной разницы между двумя способами обработки не наблюдалось. Хорошо также разрушались моно- и бициклические ароматические соединения в почве с интродуцентом и без него – на 52 и 59% при свежем нефтяном загрязнении чернозёма южного и на 49 и 39% – при многолетнем загрязнении грунта. При внесении штамма в свежезагрязнённую почву эффективнее разрушалась фракция ПАУ (41 против 18% при стимуляции) и спирто-бензольных смол (41 против 23% при стимуляции). При многолетнем загрязнении грунта, наоборот, концентрация ПАУ в почве при использовании стимулирующих приёмов снижалась сильнее, чем в почве со штаммом. Снижения содержания фракции смол в грунте не происходило, через 90 сут. оно было выше исходного.

В смешанном грунте с многолетним загрязнением нефтепродуктами исследовали динамику агрохимических показателей. Было показано увеличение содержания общего углерода через 45 сут. ремедиации, что прямо коррелировало с увеличением содержания общих нефтепродуктов в почве в этот период. Содержание водорастворимого углерода увеличивалось через 45 сут. в почве со штаммом *D. maris* AM3, и через 90 сут. оно было выше, чем в исходной почве. Наблюдаемые тенденции можно объяснить тем, что в смешанном грунте происходят разнонаправленные процессы. С одной стороны, развитие почвенной микрофлоры связано с потреблением запасов растворимого углерода, с другой – разрушение нефтепродуктов с давним сроком загрязнения сопровождается увеличением содержания водорастворимого углерода в почве. Содержание нитратного азота в обоих вариантах очистки на протяжении всего эксперимента было низким. Содержание аммонийного азота и подвижного фосфора в первой половине ремедиации снижалось, что было сопряжено с интенсивными процессами окисления нефтепродуктов, в последний месяц – увеличивалось, вероятно, вследствие высвобождения связанного аммонийного азота из почвы в процессе очистки и подвижного фосфора в ходе минерализации микробной биомассы. Изменения pH почвы в ходе очистки были незначительными.

Обоснование использования приёмов биоремедиации почв при свежем и многолетнем нефтяном загрязнении. В ходе экспериментов обнаружено, что при самоочищении почвы от свежего нефтяного загрязнения не происходило существенного увеличения содержания ОГМ и УОМ, активности почвенных дегидрогеназ и каталаз, численность денитрификаторов и нитрификаторов, активность липаз и уреаз в почве была меньше, чем при использовании приёма стимуляции естественного микробного сообщества. Токсичность этой почвы, напротив, была выше, чем при стимуляции. В связи с этим, убыль нефтяных углеводородов при самоочищении почвы на всём протяжении эксперимента была ниже на 13-15%, чем при стимуляции естественного микробного сообщества. Таким образом, на основании эффективности очистки почвы от свежего нефтяного загрязнения показано преимущество приёма стимуляции аборигенной микрофлоры перед самоочищением.

При внесении штамма *D. maris* AM3 в чернозём южный со свежим нефтяным загрязнением на всём протяжении эксперимента следующие показатели биологической активности почвы были выше, чем при стимуляции аборигенной микрофлоры: численность ОГМ, УОМ, почвенное дыхание, активность дегидрогеназ, липаз и уреаз. Это способствовало, по нашему мнению, интенсификации процессов биodeградации нефтяных углеводородов, степень разрушения которых после первого месяца очистки была в два раза выше, чем при биостимуляции. Это преимущество *D. maris* AM3 при необходимости может использоваться специалистами-биотехнологами для ускорения ремедиации в климатических зонах с коротким тёплым сезоном. Почва со штаммом-интродуцентом также отличалась меньшей

токсичностью в конце очистки по результатам фитотестирования и тестирования по дегидрогеназной активности *D. maris* AM3 на определённом этапе ремедиации (30 сут.).

Ускорение и улучшение качества очистки загрязнённой почвы под влиянием штамма *D. maris* AM3 позволяет рекомендовать его для ремедиации почв при свежем нефтяном загрязнении.

Сохранение жизнеспособности и активности штамма при повышенной кислотности среды даёт возможность применять его в условиях, когда естественные микробные сообщества малочисленны или не способны полноценно функционировать.

В смешанном грунте с многолетним загрязнением нефтепродуктами внесение *D. maris* AM3 не ускорило очистку, при использовании приёмов стимуляции и аугментации наблюдалась одинаковая скорость и степень разложения нефтяных углеводов. И при выборе способа очистки приём стимуляции может быть рекомендован как экономически более выгодный. В то же время, штамм-интродуцент положительно влиял на биологическую активность грунта. Наблюдались повышенные значения численности ОГМ от 7 до 30 сут., УОМ – от 7 до 45 сут., почвенного дыхания – от 7 до 14 сут., активности каталаз – в период 7 и 45 сут., липаз – 45 и 75 сут. по сравнению со стимуляцией естественного микробного сообщества. Также существенным было снижение фитотоксичности очищенного грунта под влиянием *D. maris* AM3, что связано, вероятно, с ингибирующим действием данного штамма на фитопатогенные микромицеты. Влияние штамма *D. maris* AM3 на качество очистки, что существенно для восстановления плодородия почв, предусматривает применение данного микроорганизма для очистки почвы или грунта от многолетнего нефтяного загрязнения.

7. ПОЛУЧЕНИЕ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩЕГО БИОПРЕПАРАТА ПУТЁМ СТИМУЛЯЦИИ АБОРИГЕННОЙ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩЕЙ МИКРОФЛОРЫ

Реализовать принцип создания оптимальных условий для развития природной нефтеокисляющей микрофлоры в ряде случаев проще в лабораторных или промышленных биореакторах. Нами оценивалась эффективность деградации углеводов нефти в почве и воде с помощью технологии, основанной на обогащении образцов загрязнённой почвы в лабораторных условиях аборигенными УОМ и индукции их ферментативных систем, катализирующих деградацию углеводов нефти.

Для получения жидкой обогащённой культуры использовалась почва, длительное время загрязнённая нефтью, поскольку в этом случае УОМ микробного почвенного сообщества уже адаптированы и частично активизированы. На первом этапе образцы нефтезагрязнённой почвы культивировали в жидкой среде с разными добавками. В ходе проведённых исследований было установлено, что среди исследуемых добавок (табл. 6), стимулирующих развитие почвенных УОМ при культивировании их в виде почвенной суспензии, оптимальным был следующий комплекс, г/л: нефть – 5,0, минеральные компоненты – 10,0 и синтетическое моющее средство (СМС) – 0,2.

Варианты стимуляции развития УОМ в почвенной суспензии

Вариант	Вносимые добавки, г/л					
	минеральные компоненты	нефть	парекс	глюкоза	СМС	синтанол
1	10,0	5,0	-	-	-	-
2	10,0	-	5,0	-	-	-
3	10,0	5,0	-	-	-	0,02
4	10,0	5,0	-	-	0,2	-
5	10,0	5,0	-	10,0	-	-
6	10,0	-	-	10,0	-	-
7	10,0	-	-	-	-	-

Количество УОМ возрастало на пять порядков (до величин кратных 10^9 клеток) по сравнению с исходным содержанием (рис. 21). Повторное внесение питательных субстратов стимулировало развитие в среде УОМ в среднем на два порядка. При этом наибольший эффект оказывало добавление L-бульона и мелассы по отдельности и в различных комбинациях. При аналогичной подготовке обогащённой культуры в твёрдой фазе количество УОМ увеличивалось примерно в 700 раз, хотя их максимальное содержание в почве было также около 10^9 КОЕ/г.

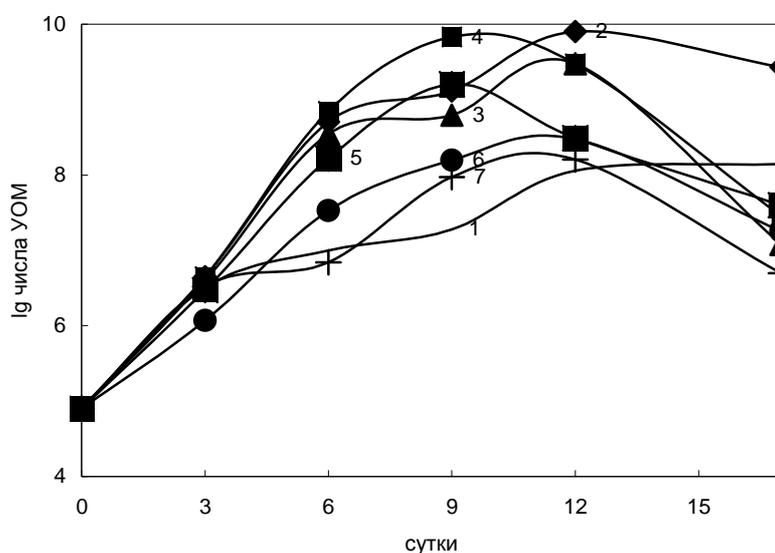


Рис. 21. Динамика численности УОМ в процессе культивирования почвенной суспензии с внесением стимулирующих добавок (номер вариантов соответствует табл. 6)

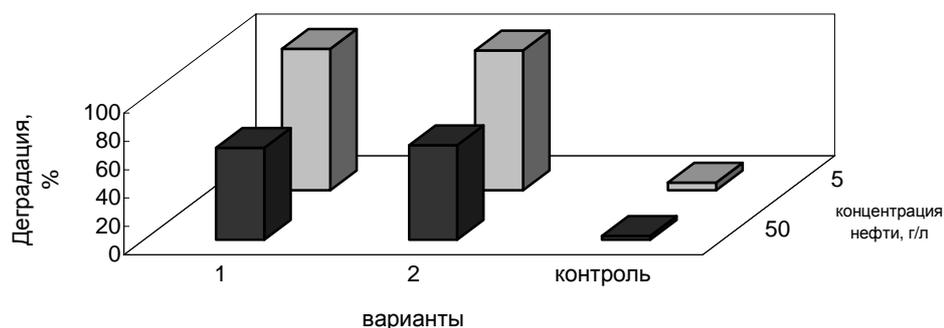
После предварительной обработки образцы, являющиеся по сути биопрепаратом – источником активной нефтеокисляющей микрофлоры, вносили в загрязнённые образцы почвы и воды одновременно с необходимыми добавками, повышающими эффективность утилизации загрязнителя. Для этой цели был использован лучший вариант жидкой обогащённой культуры с максимальной численностью УОМ (табл. 6, вариант №4), который вносили в количестве 10^7 КОЕ/г(мл) с различными комбинациями минеральных добавок и СМС (табл. 7).

Таблица 7.

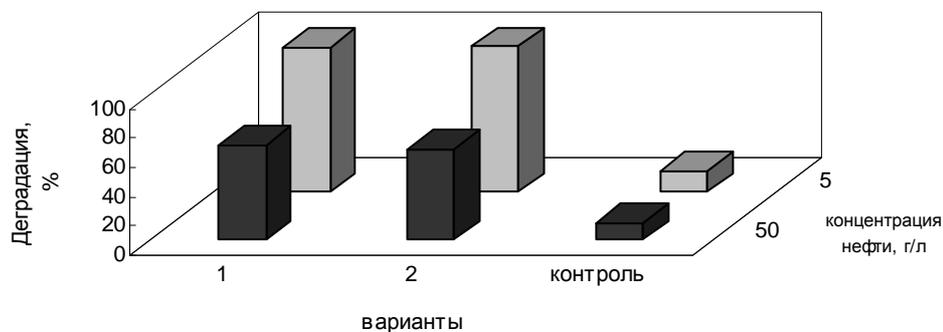
Варианты очистки загрязнённых образцов с помощью жидкой обогащённой культуры УОМ

Вариант	Образцы	Исходная концентрация нефти, г/л(кг)	Вносимые добавки, г/л(кг)	
			минеральные компоненты	СМС
1.	Вода	5,0	10,0	
2.	то же	5,0	10,0	0,2
Контроль 1.	-//-	5,0	-	-
3.	-//-	50,0	10,0	
4.	-//-	50,0	10,0	0,2
Контроль 2.	-//-	50,0	-	-
1.	Почва	5,0	10,0	
2.	то же	5,0	10,0	0,2
Контроль 1.	-//-	5,0	-	-
3.	-//-	50,0	10,0	
4.	-//-	50,0	10,0	0,2
Контроль 2.	-//-	50,0	-	-

Определение остаточного содержания нефтепродуктов в очищаемых образцах обнаружило, что использование обогащённой жидкой культуры позволило деградировать нефть за 15 сут. на 98,9-100% от исходного содержания 5 г/л(кг) как в воде, так и в почве (рис. 22).



А



Б

Рис. 22. Степень деградации нефти в загрязнённых водных (А) и почвенных (Б) образцах (номер вариантов соответствует табл. 7) за 15 сут. использования жидкой обогащённой культуры

При содержании в опытных образцах нефти в количестве 50 г/л(кг) её деструкция в почве составляла 65,0-66,8%, в жидкой среде наблюдали близкие результаты: 62,8-65,0%. В контрольных вариантах убыль нефти составляла: 2,7% в водной среде и 14,4% в почве. Таким образом, степень очистки с помощью биопрепарата была выше по сравнению с контролем в 4-8 раз в почве и в 18-24 раза в воде в зависимости от концентрации в них нефти (5 и 50 г/л(кг)).

Такой способ активизации аборигенных микробных сообществ почвы может иметь большие перспективы для практического использования, он экологически безопасен, достаточно экономичен и легко осуществим для очистки загрязнённых объектов даже большого масштаба.

В целом, проведённые исследования, основанные на комплексной оценке изменений, происходящих в почве и её микробных сообществах в условиях нефтяного загрязнения при использовании технологий биоремедиации, продемонстрировали пути повышения эффективности различных приёмов микробной очистки нефтезагрязнённых почв. Одним из них является внесение исследованных уникальных нефтеокисляющих микроорганизмов *D. maris* AM3 и *Bacillus* sp. УН2/5, способных ускорять очистку и улучшать её качество. Использование специализированных углеводородокисляющих бактерий для ликвидации нефтяного загрязнения в кислых почвах отличается научной новизной. Установленная в ходе исследований целесообразность применения штаммов *D. maris* AM3 и *Bacillus* sp. УН2/5 для очистки почв, различающихся по своим свойствам и по срокам нефтяного загрязнения, значительно расширила современные представления о возможностях нефтеокисляющих микроорганизмов.

Полученные новые данные о биологических и эколого-функциональных свойствах микробного сообщества нефтешлама с низким значением рН, в том числе, обнаруженная плазмидная детерминация свойств ацидотолерантности и деструкции нефтяных углеводородов у микроорганизмов сообщества, способствуют пониманию устойчивого функционирования естественных микробных сообществ в экстремальных условиях и создают предпосылки для использования природных процессов в технологиях очистки.

ВЫВОДЫ

1. Выделенные из микробного сообщества нефтешлама (рН 1,15) 13 штаммов, идентифицированные как *Corynebacterium* spp., *Dietzia maris* и *Bacillus* sp., являются умеренными ацидофилами, утилизирующими нефтяные углеводороды в широком диапазоне рН.

2. Новый штамм *D. maris* AM3 обладает рядом функциональных и экологических преимуществ, к которым относятся: рост в широком диапазоне рН (4-9) и температур (10-40°C), в присутствии 10% NaCl, способность к деструкции алкановых и ароматических углеводородов нефти, биоэмульгирующая активность по отношению к нефти, наличие трансмиссивной катаболической плазмиды с высокой стабильностью. После культивирования на углеводородных субстратах увеличивается гидрофобность клеток и нефтеокисляющая активность штамма *D. maris* AM3.

3. Свойство ацидотолерантности у бактерий *Corynebacterium* spp. и деградации нефтяных углеводов у штамма *D. maris* АМЗ, входящих в микробное сообщество нефтешлама, детерминируется плазмидными генами.

4. Микроорганизмы *D. maris* АМЗ и *Bacillus* sp. УН 2/5, интродуцированные в нефтезагрязнённые кислые и нейтральные почвы, отличаются высокой жизнеспособностью. Интродукция штаммов в почву со свежим нефтяным загрязнением ускоряет очистку в 2 раза в течение первого месяца ремедиации по сравнению с приёмом стимуляции, интенсифицирует биологическую активность почвы и способствует снижению её токсичности.

5. Иммунохимические методы анализа применимы для выявления штамма *D. maris* АМЗ в почве в процессе биоремедиации и количественной оценки динамики его численности. С помощью твёрдофазного иммуноферментного анализа установлено, что при интродукции штамма *D. maris* АМЗ в почву, его максимальное развитие происходит через 7-14 суток (на 1-3 порядка в зависимости от почвы и загрязнителя).

6. При свежем нефтяном загрязнении приём стимуляции естественного микробного сообщества почвы способствует более эффективной убыли нефтяных углеводов, активизации биологической активности почвы и снижению её токсичности по сравнению с самоочищением, а в случае многолетнего загрязнения этот приём сравним по степени деструкции нефтепродуктов с интродукцией штамма *D. maris* АМЗ, который на определённых этапах ремедиации повышает биологическую активность и снижает токсичность почвы.

7. Показатели активности почвенных ферментов: дегидрогеназ, каталаз, липаз и уреаз, отражающие направленность процессов биodeградации нефтяных углеводов в почве, обусловленных развитием и активизацией аборигенных и интродуцированных микроорганизмов, а также показатели токсичности очищенной почвы, определяемые по дегидрогеназной активности тест-микроорганизма, являются индикаторными для мониторинга процессов биоремедиации.

8. Оптимальная комбинация стимулирующих добавок, включающая нефть, минеральные компоненты и СМС, активизируя аборигенные углеводородокисляющие микроорганизмы в образцах загрязнённой почвы, способствует получению биопрепаратов в виде почвенной суспензии, которые эффективно очищают нефтезагрязнённую почву и воду.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

* – публикации в печатных изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК РФ

Научные статьи:

1. Плешакова Е.В., Турковская О.В. Создание и использование биокатализаторов для деструкции минеральных масел // Биотехнология. – 1993. – № 11-12. – С. 46-49.

2. Турковская О.В., Муратова А.Ю., Плешакова Е.В., Панченко Л.В. Утилизация отработанных моющих растворов с помощью микроорганизмов // Химия и технология воды. – 1996. – Т. 18, № 2. – С. 212-216.

3. Turkovskaya O.V., Muratova A.Yu., Panchenko L.V., Pleshakova E.V. Utilization of spent detergent solution and lubricating cooling liquids // Global Environmental Biotechnology / Ed. D.L. Wise. – Amsterdam: Elsevier Science B.V., 1997. – P. 799-805.

4. Плешакова Е.В., Тимофеева З.Ю. Изучение стабильности микробной деструкции анионного поверхностно-активного вещества сульфанола // Химия для медицины и ветеринарии: Сб. науч. тр. – Саратов: Изд-во СГУ, 1998. – С. 146-150.

- * 5. Плешакова Е.В., Муратова А.Ю., Турковская О.В. Деграляция минерального масла штаммом *Acinetobacter calcoaceticus* // Прикл. биохим. и микробиол. – 2001. – Т. 37, № 4. – С. 398-405.
6. Panchenko L., Turkovskaya O., Volkov M., Muratova A., Dubrovskaya Y., Pleshakova Y., Pozdnyakova N. Large scale *in situ* bioremediation of oil-slime // Proceeding of 3rd International Conference OIL POLLUTION: *Prevention, Characterization, Clean Technology*. – Gdańsk, Poland, 2002. – P. 25-33.
7. Pleshakova Ye.V., Pozdnyakova N.N., Turkovskaya O.V. Stimulation of the indigenous hydrocarbon-oxidizing microflora in the oil-contaminated soil // Proceeding of 3rd International Conference OIL POLLUTION: *Prevention, Characterization, Clean Technology* – Gdańsk, Poland, 2002. – P. 33-41.
8. Турковская О.В., Панченко Л.В., Дубровская Е.В., Плешакова Е.В., Муратова А.Ю., Позднякова Н.Н., Игнатов В.В. Биотехнологии для очистки окружающей среды // Высокие технологии – путь к прогрессу: Сб. науч. тр. – Саратов: Научная книга, 2003. – С. 76-81.
9. Pleshakova E., Dubrovskaya E., Turkovskaya O. Stimulation of the activity of oil oxidizing microorganisms in contaminated soil // Proceeding of 8th International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil. – Gent, Belgium, 2003. – 8 p.
- * 10. Плешакова Е.В., Дубровская Е.В., Турковская О.В. Приемы стимуляции аборигенной нефтеокисляющей микрофлоры // Биотехнология. – 2005. – № 1. – С. 42-50.
11. Плешакова Е.В., Матора Л.Ю., Турковская О.В. Интродукция нефтеокисляющего штамма *Dietzia maris* в загрязненную почву // Сборник статей / Под ред. О.В. Турковской. – Саратов: Научная книга, 2005. – С. 148-156.
- * 12. Плешакова Е.В., Позднякова Н.Н., Турковская О.В. Получение нефтеокисляющего биопрепарата путем стимуляции аборигенной углеводородокисляющей микрофлоры // Прикл. биохим. и микробиол. – 2005. – Т. 41, № 6, – С. 634-639.
13. Плешакова Е.В., Дубровская Е.В., Турковская О.В. Эффективность технологий микробной очистки почв от нефтяного загрязнения // Энергосбережение в Саратовской области. – 2006. – № 2 (24). – С. 17-19.
14. Pleshakova E., Dubrovskaya E., Turkovskaya O. Stimulation of the activity of oil oxidizing microorganisms in contaminated soil // *New Research on the Environment and Biotechnology* / Eds. A.E. Kuznetsov and G.E. Zaikov. – Nova Science Publishers, Inc., New York, 2006. – P. 7-49.
15. Слюзова О.В., Груздева М.С., Плешакова Е.В. Снижение воздействия кадмий содержащих токсичных веществ на живые организмы // Энергосбережение в Саратовской области. – 2007. – № 2 (28). – С. 24-26.
16. Плешакова Е.В., Голубев С.Н., Турковская О.В. Биодеграляция нефтяных углеводов штаммом *Dietzia maris*, ее генетические особенности // Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология. – 2007. – Т. 7, Вып. 1. – С. 54-57.
- * 17. Плешакова Е.В., Дубровская Е.В., Турковская О.В. Сравнение эффективности интродукции нефтеокисляющего штамма *Dietzia maris* и стимуляции естественных микробных сообществ для ремедиации загрязнённой почвы // Прикл. биохим. и микробиол. – 2008. – Т. 44, № 4. – С. 430-437.
18. Плешакова Е.В., Голубев С.В., Колесникова О.В. Изучение реизолятов штамма *Dietzia maris* AM3 после его культивирования на углеводородных субстратах // Биологические науки Казахстана. – 2008. – № 1. – С. 53-59.
19. Плешакова Е.В., Шейкина А.С. Восстановление численности микроорганизмов азотного цикла в процессе рекультивации нефтезагрязненной почвы // Энергосбережение в Саратовской области. – 2008. – №3 (33). – С. 37-39.
20. Плешакова Е.В. Генетический анализ микробных консорциумов модельной установки для очистки сульфенолсодержащих сточных вод, возможности его практического использования // Вода и экология. Проблемы и решения. – 2008. – № 3. – С. 50-56.
21. Dubrovskaya E., Pleshakova E., Turkovskaya O. Using molasses for stimulation of the degradative and activities of the microbial community in soil contaminated with oil shale liquid fuel // *Soil Contamination: New Research* / Ed. A.N. Dubois. – USA: Nova Science Publishers, 2008. – P. 121-138.

22. Плешакова Е.В., Нежинская Е.Г. Изменение биологической активности нефтезагрязненной почвы при самоочищении и использовании технологии стимуляции аборигенной микрофлоры // Вестник ОГУ. Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы экологии Южного Урала». – 2009. – Ч. III. – С. 79-481.

23. Плешакова Е.В., Матора Л.Ю., Турковская О.В. Применение иммунохимических методов для мониторинга штамма *Dietzia maris*, интродуцированного в нефтезагрязненную почву // Бюллетень МОИП. – 2009. – Т. 114, вып. 3. Приложение 1. Ч 2. Экология. Природные ресурсы. Рациональное природопользование. Охрана окружающей среды. – С. 233-239.

24. Плешакова Е.В., Варюшин А.В. Приёмы биотестирования для оценки токсичности нефтезагрязнённой почвы в процессе биоремедиации // Сб. науч. тр. 4-ой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Экологические проблемы промышленных городов». – Саратов, 2009. – Ч. 1. – С. 50-52.

25. Беляков А.Ю., Плешакова Е.В., Любунь Е.В., Решетников М.В. Изменение активности ферментов в почве, загрязненной тяжелыми металлами, в процессе фиторемедиации // В мире научных открытий. – 2010. – № 4 (10), Ч. 5. – С. 34-36.

* 26. Плешакова Е.В., Кабанцева Е.Г., Черновол В.С. Активность дегидрогеназ в нефтезагрязненных почвах как инструмент мониторинга технологий биоремедиации // Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология. – 2010. – Т. 10, Вып. 1. – С. 40-47.

27. Плешакова Е.В., Любунь Е.В., Варюшин А.В., Нежинская Е.Г. Оценка токсичности загрязнённой почвы после биоремедиации по дегидрогеназной активности бактерий // Первые Международные научно-практические Беккеровские чтения: Сб. науч. тр. – Волгоград, 2010. – Ч. 2. – С. 302-303.

* 28. Плешакова Е.В. Разработка нового метода определения токсичности нефтезагрязнённой почвы // Вестник СГТУ. – 2010. – № 3 (46), Вып. 1. – С. 188-193.

* 29. Плешакова Е.В. Экологические аспекты кислотоустойчивости нефтеокисляющих микроорганизмов в ходе биоремедиации загрязнённых почв // Поволж. экол. журн. – 2010. – № 4. – С. 375-383.

* 30. Плешакова Е.В., Матора Л.Ю., Турковская О.В. Нефтеокисляющий штамм *Dietzia maris* и возможности его использования для биоремедиации загрязненной почвы // Вестник МГОУ. Серия Естественные науки. – 2010. – № 4. – С. 82-89.

Патенты:

* 31. Патент RU 2 288 044 С1, МПК В09С 1/08. Способ очистки грунта от нефтяных загрязнений / Дубровская Е.В., Турковская О.В., Плешакова Е.В. – 9 с.: ил. Опубликовано 27.11.2006. Бюл. № 33.

* 32. Патент RU 2 301 258 С2, МПК С12N 1/26 В09С 1/10. Способ очистки грунта от нефтяных загрязнений / Дубровская Е.В., Турковская О.В., Плешакова Е.В. – 9 с.: ил. Опубликовано 20.06.2007. Бюл. № 17.

Учебно-методические пособия:

33. Общая биология: Материалы к гос. аттестации выпускников по спец. 011600 – «Биология» / Степанов С.А., Забалуев А.П., Плешакова Е.В. и др. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2006. – 232 с.

34. Руководство к практическим занятиям по экологической токсикологии: Учеб. пособие для студ. биол. фак., обуч. по спец. 011600, 032400.00 «Биология», 013100 «Экология» / Сост. Е.В. Плешакова, С.А. Коннова, Е.В. Степанова, О.В. Слюзова; Под ред. проф. В.В. Игнатова. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2006. – 56 с.

35. Экология. Материалы к государственной аттестации выпускников по специальности – «Экология» / Аникин В.В., Беляченко А.В., Плешакова Е.В. и др. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2009. – 188 с.

Тезисы и материалы конференций:

36. Dubrovskaya E.V., Pleshakova E.V., Panchenko L.V., Muratova A.Yu. Structure of ABS- and Aph-degrading microbial communities // Abstr. Book of 9th European Congress on Biotechnology. – Brussels, Belgium, 1999. – ECB9/2717.

37. Turkovskaya O., Panchenko L., Dubrovskaya E., Pleshakova E., Pozdnyakova N. The application of active sludge in bioremediation processes // Abst. Book of Seventh International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil. – Leipzig, Germany, 2000. – V. 2. – P. 1296.

38. Плешакова Е.В. Генетические аспекты деструкции сульфанола микробными консорциумами модельной установки // Мат. 2-го съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. – Санкт-Петербург, 2000. – Т. 2. – С. 17.

39. Pleshakova E.V., Turkovskaya O.V., Pozdnyakova N.N. Method for stimulation the development of hydrocarbon-oxidizing microorganisms in soil // Abst. Book of 9th International Symposium on Microbial Ecology. – Amsterdam, The Netherlands, 2001. – P. 23.056.

40. Турковская О.В., Панченко Л.В., Муратова А.Ю., Дубровская Е.В., Плешакова Е.В., Позднякова Н.Н. Использование активного ила в процессе биоремедиации // Экобиотехнология: борьба с нефтяным загрязнением окружающей среды: Тез. докл. конф. – Пушино, 2001. – С. 73-74.

41. Dubrovskaya E., Pleshakova E., Turkovskaya O. Study of dynamic for the development of microbial association during the biostimulation of oil-contaminated soil // Abstr. book of Xth International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, The world of microbes. – Paris, France, 2002. – P. 203.

42. Плешакова Е.В., Дубровская Е.В. Исследование динамики микробного сообщества нефтезагрязненной почвы в процессе биорекультивации // Стратегия взаимодействия микроорганизмов с окружающей средой: Мат. первой региональной конференции молодых ученых. – Саратов, 2002. – С. 6.

43. Плешакова Е.В. Использование ацидотолерантных микроорганизмов для восстановления нефтезагрязненных земель // Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов, посвященная 115-летию со дня рождения академика Н.И. Вавилова: Тез. докл. – Саратов, 2002 – С. 103.

44. Турковская О.В., Дубровская Е.В., Муратова А.Ю., Панченко Л.В., Плешакова Е.В., Позднякова Н.Н. Возможности современных приемов биоремедиации окружающей среды // Биотехнология – состояние и перспективы развития: Мат. 1-го Международного конгресса. – Москва, 2002. – С. 290.

45. Dubrovskaya E.V., Pleshakova E.V., Turkovskaya O.V. Possibilities of use of a biostimulation method for cleaning up soil polluted by a high concentration of residual oil // Abstr. of International Symposium Biochemical Interactions of Microorganisms and Plants with Technogenic Environmental Pollutants. – Saratov, Russia, 2003. – С. 10-11.

46. Плешакова Е.В. Перспективы использования кислотоустойчивых микроорганизмов для восстановления нефтезагрязненных земель // Биотехнология: состояние и перспективы развития: Тез. докл. 2-го Московского международного конгресса. – Москва, 2003. – Ч. 2. – С. 37-38.

47. Плешакова Е.В., Матора Л.Ю. Изучение эффективности биоремедиации нефтезагрязненной почвы при интродукции в нее штамма *Rhodococcus maris* AM3 // Биотехнология – охране окружающей среды: Тез. докл. 2-ой международной научной конференции. – Москва, 2004. – С. 178.

48. Плешакова Е.В. Влияние интродукции штаммов-деструкторов на эффективность биоремедиации нефтезагрязненных почв // Стратегия взаимодействия микроорганизмов с окружающей средой: Мат. второй региональной конференции молодых ученых. – Саратов, 2004. – С. 49-50.

49. Плешакова Е.В., Матора Л.Ю., Турковская О.В. Перспективы использования нефтеокисляющего штамма *Dietzia maris* для биоремедиации загрязненной почвы // «Вавиловские чтения-2004»: Мат. Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 117-й годовщине со дня рождения академика Н.И. Вавилова. – Саратов, 2004. – С. 85-87.

50. Плешакова Е.В. Ремедиация загрязненной почвы с использованием нефтеокисляющего штамма *Dietzia maris* // Биотехнология: состояние и перспективы развития: Тез. докл. 3-го Московского международного конгресса. – Москва, 2005. – Ч. 2. – С. 26-27.

51. Плешакова Е.В., Матора Л.Ю., Никифоров М.В. Интродукция нефтеокисляющих микроорганизмов в загрязненную почву // Проблемы биодеструкции техногенных загрязнителей

окружающей среды: Тез. докл. международной научной конференции. – Саратов, 2005. – С. 87-88.

52. Панченко Л.В., Дубровская Е.В., Плешакова Е.В., Турковская О.В. Рекультивация почвогрунтов, загрязненных нефтепродуктами в условиях промплощадок: опыт *in situ* и *ex situ* // Проблемы биодеструкции техногенных загрязнителей окружающей среды: Тез. докл. международной научной конференции. – Саратов, 2005. – С. 86-87.

53. Дубровская Е.В., Плешакова Е.В., Турковская О.В. Нефтеокисляющий потенциал почвенных микробных сообществ в процессах биоремедиации загрязненных почв и грунтов // Проблемы биодеструкции техногенных загрязнителей окружающей среды: Тез. докл. международной научной конференции. – Саратов, 2005. – С. 68.

54. Турковская О.В., Муратова А.Ю., Дубровская Е.В., Плешакова Е.В., Голубев С.Н., Бондаренкова А.Д. Деструктивный потенциал микроорганизмов и возможности его повышения // Микробное разнообразие: состояние, стратегия сохранения, биологический потенциал: Мат. 2-ой международной конференции. – Пермь-Казань-Пермь, 2005. – С. 101-102.

55. Плешакова Е.В. Изучение штамма-деструктора углеводородов нефти *Dietzia maris* AM3 и возможности его использования для биоремедиации загрязненной почвы // Актуальные проблемы современной микробиологии: Тез. докл. Всерос. Молодежной школы-конференции. – Москва, 2005. – С. 101-102.

56. Плешакова Е.В., Дубровская Е.В., Турковская О.В. Использование нефтеокисляющих микроорганизмов для ремедиации загрязненных почв // Микробные биотехнологии: Тез. докл. Международной научной конференции. – Одесса, 2006. – С. 204.

57. Колесникова О.В., Плешакова Е.В. Исследование гидрофобности и деструктивной активности реизолятов нефтеокисляющего штамма *Dietzia maris* // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: Мат. III межрегиональной конференции молодых ученых. – Саратов, 2006. – С. 50.

58. Плешакова Е.В., Дубровская Е.В., Турковская О.В. Интродукция нефтеокисляющих микроорганизмов в загрязненную почву: проблемы и перспективы // Микроорганизмы и биосфера: Мат. Международной научной конференции. – Москва, 2007. – С. 97-98.

59. Pleshakova E., Dubrovskaya E., Turkovskaya O. Dynamics of dehydrogenase and catalase activities in oil-polluted soil, as studied with two bioremediation techniques // Abst. Book of EGU General Assembly. – Vienna, Austria, 2008. – V. 10. – EGU2008-A-07857.

60. Плешакова Е.В., Кабанцева Е.Г., Черновол В.С. Использование дегидрогеназной активности нефтезагрязненных почв для мониторинга биоремедиации // Актуальные проблемы биоэкологии: Мат. Международной научно-практической конференции. – Москва, 2008. – С. 177-179.

61. Нежинская Е.Г., Финогеев Д., Варюшин А.В., Плешакова Е.В. Биодиагностика нефтезагрязнённой почвы при её самоочищении и использовании технологии биостимуляции // Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии: Тез. докл. XXII зимней молодежной научной школы. – Москва, 2010. – С. 109.

62. Нежинская Е.Г., Плешакова Е.В. Оценка эффективности приёмов биоремедиации нефтезагрязнённых почв по изменению активности дегидрогеназ // Биотехнология: экология крупных городов: Мат. Московской международной научно-практической конференции. – Москва, 2010. – С. 134-135.