

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

/ Заведующий кафедрой

 Волова Т.Г.

« 20 » июня 2017 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ


Фитобиоремедиация почв, загрязненных нефтепродуктами

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель  д.б.н., проф. Прудникова С.В.
19.06.17

Выпускник  Ларькова А.Н.

Рецензент  к.б.н., доцент Евграфова С.Ю.

Красноярск 2017

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему «Фитобиоремедиация почв, загрязненных нефтепродуктами» содержит 61 страницу текстового документа, 11 иллюстраций, 5 таблиц, 67 использованных источников.

Ключевые слова: фиторемедиация, биоремедиация, ризосферная микрофлора, углеводородокисляющие бактерии, нефтезагрязненная почва.

Целью работы была оценка возможности использования некоторых штаммов углеводородокисляющих бактерий почв г. Красноярска и северных районов Красноярского края для повышения эффективности фиторемедиации почв, загрязненных нефтепродуктами. В задачи исследования входило: 1) Выделение из почвы г. Красноярска и северных районов Красноярского края доминирующие почвенные бактерии, устойчивые к нефтезагрязнению и идентификация их; 2) Выявление наличия плазмид в отобранных штаммах бактерий; 3) Оценка влияния загрязнения почвы нефтепродуктами на ризосферную микрофлору эспарцета песчаного (*Onobrychis arenaria*); 4) Оценка влияния углеводородокисляющих бактерий на ризосферную микрофлору эспарцета песчаного (*Onobrychis arenaria*) при выращивании на нефтезагрязненных почвах в лабораторных условиях и в натурном эксперименте; 5) Оценка биоремедиационного потенциала эспарцета песчаного в сочетании с некоторыми видами выделенных штаммов УВОМ

Тема исследования связана с актуальным направлением – исследованием сообщества почвенных микроорганизмов, устойчивых к загрязнению углеводородами. Исследования показали, что углеводородокисляющие микроорганизмы снижают фитотоксичность нефтезагрязненных почв, а дополнительное внесение суспензии штаммов нефтеокисляющих бактерий оказывает существенное влияние на ризосферную микрофлору, активизируя конкурентные взаимоотношения в микробиоценозах.

Работа выполнялась на базовой кафедре биотехнологии ИФБиТ

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1 Обзор литературы	7
1.1 Проблема загрязнения окружающей среды углеводородами нефти	7
1.1.1 Химический состав нефти и нефтепродуктов	7
1.1.2 Механизмы отрицательного действия углеводородов нефти на окружающую среду	8
1.1.3 Влияние нефтяных загрязнений на растения.....	9
1.1.4 Влияние нефтяных загрязнений на микрофлору почвы	12
1.2 Методы очистки окружающей среды от загрязнения углеводородами нефти	14
1.2.1 Фиторемедиация нефтезагрязненных почв.....	15
1.2.2 Биоремедиация нефтезагрязненных почв с помощью микроорганизмов	18
1.2.3 Биодеструкция углеводородов плазмидосодержащими штаммами.....	26
1.2.4 Влияние микроорганизмов на процессы фиторемедиации окружающей среды от органических загрязнителей.....	28
2 Объекты и методы исследования	31
2.1 Объекты исследования	31
2.2 Методы выделения микроорганизмов	31
2.3 Методы идентификации микроорганизмов	32
2.4 Методы исследования влияния углеводородокисляющих бактерий на ризосферную микрофлору эспарцета песчаного	33
2.5 Методы исследования ризосферной микрофлоры	34
2.6 Выделение плазмидной ДНК из клеток бактерий.....	35
3 Результаты исследования	37

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	38
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	41

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время при очистке разлива нефти на почве и береговых линиях требуются трудоемкие методы, имеющие много недостатков. Например, использование высокого давления при промывке для вытеснения нефти может уничтожить микробные популяции, в то время как химические сорбенты и диспергаторы могут оказывать негативное действие на окружающую среду. Кроме того, эти методы требуют много времени и способны лишь до некоторой степени удалять нефтяные загрязнения, оставляя за собой большое количество углеводородов, адсорбированных в почве. Таким образом, эти обычные действия первого реагирования не могут обеспечить эффективную очистку разливов нефти в течение короткого периода времени. Поэтому существует настоятельная необходимость в исследовании других экологически чистых методов для удаления нефтяных загрязнений в почве. На сегодняшний день существует целый ряд технологий, доступных для восстановления загрязненной нефтью почвы, одной из которых является биоремедиация,

Одним из решений важной экологической проблемы утилизации нефтяных загрязнений является применение биологических объектов, способных использовать в качестве субстрата углеводороды [1]. Углеводороды в почве разлагаются в результате деятельности углеводородокисляющих микроорганизмов, способных окислить углеводороды до углекислого газа и воды или превращать их в соединения, утилизируемые другими микроорганизмами. Практически все углеводороды, входящие в состав нефти, могут быть объектом микробиологического воздействия

Углеводородокисляющие микроорганизмы (УВОМ) широко распространены в природных экосистемах, встречаются, главным образом, среди аэробных форм [2, 3]. От других гетеротрофных микроорганизмов они отличаются наличием комплекса ферментов, окисляющих углеводороды и способностью к поглощению гидрофобного субстрата [4, 5, 6].

Немаловажную роль в процессах трансформации нефти и нефтепродуктов играют плазмиды, которые увеличивают метаболическую активность микроорганизмов и ускоряют процессы трансформации нефти. Доказано, что присутствие плазмид ускоряет и расширяет способности штаммов утилизировать углеводороды, поэтому необходимо проводить исследования сообщества почвенных микроорганизмов для выявления плазмидосодержащих штаммов.

Создание биологических препаратов, которые в короткие сроки оказывают влияние на нефтяные загрязнения почв, остается одной из ключевых проблем современности. В настоящее время нефть является одним из основных загрязнителей окружающей среды, поэтому важно знать все способы её утилизации, не оказывающие негативного влияния на биосферу.

В связи с этим цель настоящей работы – оценить возможность использования некоторых штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из почв г. Красноярска и северных районов Красноярского края, для повышения эффективности фиторемедиации почв, загрязненных нефтепродуктами.

Были поставлены следующие задачи:

1. Выделить из образцов почв г. Красноярска и Туруханского района Красноярского края доминирующие почвенные бактерии, устойчивые к нефтезагрязнению, и провести их идентификацию.
2. Выявить наличие плазмид в отобранных штаммах бактерий.
3. Оценить влияние загрязнения почвы нефтепродуктами на ризосферную микрофлору эспарцета песчаного (*Onobrychis arenaria*).
4. Оценить влияние углеводородокисляющих бактерий на ризосферную микрофлору эспарцета песчаного (*Onobrychis arenaria*) при выращивании на нефтезагрязненных почвах в лабораторных условиях и в натурном эксперименте.
5. Оценить биоремедиационный потенциал эспарцета песчаного в сочетании с некоторыми видами выделенных штаммов УВОМ.

1 Обзор литературы

1.1 Проблема загрязнения окружающей среды углеводородами нефти

Жидкие углеводороды являются одними из самых распространенных и наиболее экологически опасных (по токсичности; масштабу, длительности и устойчивости действия) загрязнителей природной среды. Их основными источниками являются нефть и нефтепродукты (моторное топливо, масла, углеводородные растворители), которые могут попадать на поверхность почвы различными путями, например, при бурении скважин на нефтяных месторождениях, авариях танкеров или течи в нефтепроводах, транспортировке и переработке сырой нефти, а также при очистке отстойников, танкеров и автоцистерн от остатков сырой нефти, и нефтепродуктов [7].

1.1.1 Химический состав нефти и нефтепродуктов

Нефть и продукты ее переработки представляют собой чрезвычайно сложную, непостоянную и разнообразную смесь углеводородов различного строения и высокомолекулярных смолисто-асфальтеновых веществ. В нефти выделяют легкую фракцию (точка кипения 200 °С), метановые углеводороды, включая твердые парафины, циклические углеводороды, смолы и асфальтены, сернистые соединения.

Воздействие нефти и нефтепродуктов на экосистемы определяется совокупностью содержащихся в них компонентов. В основном нефть состоит из алифатических углеводородов, в некоторых случаях (в зависимости от ее происхождения) в ней могут содержаться алициклические и ароматические углеводороды. В небольших количествах в состав нефти входят также кислородсодержащие соединения, как, например, альдегиды, кетоны и карбоновые кислоты, серо- и азотсодержащие [1, 8].

Основные товарные виды жидких нефтепродуктов представляют собой углеводородные фракции, получаемые из нефти в процессе перегонки и вторичной переработки: бензины (C4-C12, т. кип. 40-200 °C), керосины (C12-C16; 200-300°C), дизельные топлива (C16-C20; 300-400 °C), котельные топлива, масла разнообразного назначения, мазуты. Наряду с углеводородами в нефтепродуктах, как и в нефти, содержатся соединения с атомами H, N и O. Помимо этого постоянными компонентами товарных нефтепродуктов являются различные добавки, улучшающие их эксплуатационные свойства (антидетонаторы, антиокислители, ингибиторы коррозии и др.) [8].

Поступая в почву, алканы легкой фракции C5-C11 оказывают наркотическое и токсическое влияние на живые организмы. Особенно быстро действуют нормальные алканы с короткой углеродной цепью. Легкая фракция мигрирует по почвенному профилю и водоносному горизонту, расширяя ореол первоначального загрязнения. На поверхности эта фракция подвергается процессам разложения, наиболее быстро перерабатывается микроорганизмами и исчезает. При просачивании смолисто-асфальтеновых компонентов нефти сверху почвы, они сорбируются в основном в верхнем (гумусовом) горизонте, прочно цементируя пространство почвы. Смолисто-асфальтеновые компоненты гидрофобны. Обволакивая корни растений, они резко ухудшают поступление к ним влаги, в результате растения гибнут и долго не восстанавливаются на этой территории. Ароматические углеводороды нефти составляют от 5 до 55 %. Это наиболее токсичные компоненты нефти.

1.1.2 Механизмы отрицательного действия углеводородов нефти на окружающую среду

Основными факторами отрицательного воздействия нефтяного загрязнения почвы на биологические объекты являются токсическое действие углеводородов нефти и изменение физико-химических свойств почвы. Влияние нефтяного загрязнения на физико-химические свойства почвы связано, главным

образом, с обволакиванием нефтью почвенных частиц в связи, с чем происходит сильное увеличение гидрофобности почвы, она утрачивает способность впитывать и удерживать воду, происходит вытеснение воздуха из почвенных пор, и, в конечном итоге, нарушаются водный и воздушный режимы почвы [9].

Нефтяное загрязнение ингибирует активность ферментов, участвующих в углеводном обмене: инвертазы, амилазы, целлюлазы, ксиланазы, следствием чего является замедление процессов распада растительных остатков, изменение трансформации органических соединений [10]. Снижается интенсивность ферментативного превращения углеводов, что приводит в свою очередь к торможению передвижения поступающего в почву органического материала и накопленной в нем энергии, а также аккумуляции его в почве в форме гумуса [10].

1.1.3 Влияние нефтяных загрязнений на растения

Согласно работам А. В. Назарова [11], угнетение и гибель растений на нефтезагрязненной почве при доступности воды и воздуха происходит обычно через 10-15 дней после их прорастания; до этих сроков, как правило, никаких видимых признаков угнетения не наблюдается. Массовая гибель проростков отмечена многими авторами. Причем при благоприятном водном режиме нефтезагрязненного местообитания или в почве с длительным сроком загрязнения наблюдается большое количество проросших растений, которые в первое время после прорастания не испытывают видимого угнетения. Это явление не связано с ухудшением свойств нефтезагрязненной почвы, так как наблюдается и при внесении в почву с нефтью композитных смесей, восстанавливающих промывной и воздушный режим почвы. Также оно не объясняется прямой токсичностью углеводородов в почве, загрязненной нефтью, так как массовая гибель проростков отмечена как в свежее загрязненной почве, так и в почве через несколько лет после загрязнения.

Период острого токсического действия углеводородов при нефтяном загрязнении не длителен, так как он обусловлен легкими фракциями нефти, которые относительно быстро выветриваются и разрушаются. Доказано что загрязнение нефтью в количестве 10% от массы почвы полностью подавляет развитие растений [12].

Однако известно, что растения очень чувствительны к нефтяному загрязнению. По некоторым данным, полная гибель травостоя происходит при утечке 1,1 л/м², или содержании 0,5 % нефти в 15 см слое почвы. Сильное отрицательное влияние загрязнения на растительность отмечено в условиях низко арктической тундры Канады и Аляски, средней тайги, южной тайги, украинской степи, тропической зоны с длительностью восстановления растительного покрова до 10-20 лет при сильном нефтезагрязнении.

Тем не менее, существуют экосистемы, где нефтяное загрязнение оказывает слабое негативное воздействие или даже влияет на растения положительно. В условиях пустынь и полупустынь на богатых битумами почвах, находящихся над зонами глубинных разломов нефтеносных территорий, часто отмечается стимулирование растений. Они имеют ярко-зеленый цвет в течение всего вегетативного сезона, в то время как вне этих зон растительный покров выгорает к началу июня, высота растений в 2-3 раза выше, чем на незагрязненных участках, соответственно выше и продуктивность растительных сообществ [10]. Предлагается даже использовать нефть, нефтепродукты (мазут, битумные смеси и др.), шламовые отходы в качестве противозерозионных средств для закрепления песков и для улучшения их зарастания растениями в зоне пустынь и полупустынь.

Что касается прорастания растений при содержании 3% углеводородов, то скорость ингибирования прорастания кукурузы и пшеницы составляет 51,3% и 48,4% соответственно [13].

Слабо реагирует на загрязнение нефтью гидрофитная и водная растительность [11]. Так, загрязнение маршей приводит к гибели произрастающих там растений, но в большинстве случаев происходит быстрое

их восстановление [11]. Также отмечено, что при загрязнении нефтью пресноводного марша р. Коннектикут некоторые виды растений (*Ceratophyllum demersum* и *Culichium arundinaceum*) даже увеличили свою численность [11]. Ряд водных и гидрофитных растений: камыш озерный, рогоз узколистный, рогоз широколистный, тростник обыкновенный, сусак зонтичный, осока водная, роголистник темно-зеленый, уруть мутовчатая, элодея канадская – устойчивы к загрязнению нефтью до концентрации 10 г/л воды; загрязнение 1 г/л обладает стимулирующим эффектом на данные растения [11].

Продуцирование токсичных для растений веществ микромицетами в условиях нефтяного загрязнения почвы позволяет объяснить некоторые литературные данные. В ризосфере растений, произрастающих в нормальных условиях на незагрязненной почве, доля сапротрофных немикоризообразующих микромицетов в общей численности ризосферных микроорганизмов обычно невысока и не превышает 1% [11]. Их доля в ризосферной зоне резко повышается лишь тогда, когда растение находится на последней стадии своего развития, при отмирании корней [11].

В исследованиях при анализе численности микромицетов в зоне ризосферы и ризопланы клевера лугового и костра безостого, выращенных на нефтезагрязненной и чистой почве, было подтверждено, что на почве без нефти она составляет у обоих видов десятые доли процента численности гетеротрофных микроорганизмов. С ростом концентрации в почве нефти доля несимбиотических грибов в зоне ризосферы и ризопланы увеличивается до нескольких десятков процентов, причем в зоне корней клевера лугового это возрастание более значительно, чем корней костра безостого, и при 30 %-ном загрязнении составляет 69,3 % общей численности микроорганизмов. При этом отмечается меньшая устойчивость к нефтяному загрязнению клевера лугового, чем костра безостого.

Показана высокая зависимость всхожести клевера лугового на почвенных вытяжках от численности микромицетов в соответствующей почве. Это указывает на выработку сапротрофными грибами фитотоксичных веществ. При

ингибировании сапротрофных грибов с помощью симбиотических микроорганизмов, антагонистичных данным микромицетам, удастся повысить выживаемость и биомассу растений, посаженных на нефтезагрязненной почве. Результаты, полученные в работе А.В. Назарова, в целом подтверждают гипотезу Т.Г. Мирчинк, которая, однако, была основана на данных о росте численности микромицетов при нефтяном загрязнении в почве. Исследования показали, что в реальных условиях наибольшее значение в резком увеличении фитотоксичности нефтезагрязненной почвы играют ризосферные сапротрофные микромицеты.

С повышением дозы нефти в почве их численность в ризосферной зоне возрастает намного больше, чем в эдафосферной, и, соответственно, фитотоксичность ризосферной почвы выше [11].

1.1.4 Влияние нефтяных загрязнений на микрофлору почвы

При загрязнении биотопа нефтью или нефтепродуктами происходит постепенная смена доминантов микробного сообщества. В частности, по данным N.A. Sorkhoh с соавторами [14] в пробах почвы, взятых на территории Кувейта и Саудовской Аравии, в первые недели доминируют бактерии рода *Rhodococcus*, затем *Bacillus* и *Arthrobacter*, в конце третьей недели появляются *Pseudomonas* и *Streptomyces*. В. В. Ильинский с соавторами [15] на примере углеводородокисляющих бактерий Можайского водохранилища показал, что при загрязнении водоема дизельным топливом на начальных этапах деструкции доминировали *Acinetobacter* и *Arthrobacter*, затем их сменяли микроорганизмы *Rhodococcus*, через четыре недели к ним присоединялись псевдомонады, которые сохраняли свое доминантное положение до конца эксперимента (через два месяца). При внесении в природную воду нефти на первой неделе доминировали *Rhodococcus* и *Arthrobacter*, затем в сообществе преобладали бактерии рода *Pseudomonas*. К концу эксперимента в углеводородокисляющем сообществе доминировали *Acinetobacter* и *Arthrobacter* [16].

А. Wolińska отметила, что представители родов *Micrococcus* и *Rhodococcus* являются основными автохтонными бактериями, которые присутствуют в почве, загрязненной моторным маслом, в то время как виды родов *Bacillus sp.* и *Paenibacillus sp.* присутствовали в почвах с отработанными маслами [17].

Исследования С. Ю. Шарковой, Е. А. Полянковой и Е. А. Парфеновой показали, что по степени увеличения численности при загрязнении черноземной почвы нефтью основные группы микроорганизмов образуют следующий ряд: актиномицеты > аммонифицирующие бактерии > спорообразующие бактерии > грибы. При этом у микроскопических грибов наблюдается снижение разнообразия, у бактерий – рост. Исследования ученых по изучению нитрификационной способности почвы при разном уровне загрязнения показывают, что количество нитратного азота снижается с увеличением количества сырой нефти, что свидетельствует о снижении нитрифицирующей способности, ухудшении азотного режима почвы, и, следовательно, обеспечения растений азотным питанием [18].

Ф. Abbasian и его коллеги применили метод пироквенирования для исследования изменений в микробной популяции почв, загрязненных сырой нефтью. Ими установлено, что загрязнение сырой нефтью представляет серьезные последствия для общей популяции микроорганизмов и их биоразнообразия в почвах, причем негативное действие в значительной степени зависит от концентрации сырой нефти. Показано, что загрязнение сырой нефтью создает более однородную среду в почве с точки зрения микробного разнообразия, и многие из микроорганизмов, чувствительных к составляющим компонентам нефти, гибнут. Представители *Fibrobacterales*, *Thermoanaerobacterales*, *Nautiliales*, *Enterobacterales*, *Thermotogales*, *Ustilaginales* и *Plocamiales* имеют высокую восприимчивость к загрязнению и не обнаруживаются при концентрации нефти в почве от 0,5 до 2,5 %; *Aquificales*, *Thermomicrobiales*, *Chroococcales* (а *Cyanobacteria*), *Deinococcales*, *Candidatus Brocadiales*, *Acholeplasmatales* и *Entomoplasmatales* – при 5%;

Bacteroidales, *Oscillatoriales*, *Selenomonadales*, *Gemmatimonadales*, *Nitrospirales* и *Glomerellales* – 10%. Микроорганизмы порядка *Actinomycetales*, *Mycobacterium sp.*, *Nocardia sp.* и *Pseudonocardia sp.* являлись доминирующими микроорганизмами в контрольных образцах, при внесении сырой нефти их численность увеличивалась. Представители порядков *Clostridiales* (*Clostridium sp.*, *Symbiobacterium sp.* и *Oxobacter sp.*) и *Bacillales* (*Bacillus sp.* и *Brevibacillus sp.*) имеют хорошую выживаемость при высоких концентрациях загрязнителя в среде. Грамотрицательные представители *Flavobacteriales*, *Pseudomonadales*, *Burkholderiales*, *Rhizobiales*, *Sphingomonadales*, являются доминантными микроорганизмами в загрязненных образцах почвы. Наибольшей численностью при концентрации нефти в почве 0,5% обладали *Flavobacteriales* (в основном *Flavobacterium sp.*), *Pseudomonadales* (*Pseudomonas sp.*), *Burkholderiales* (*Variovorax sp.* и *Brachymonas petroleovorans*) и *Rhizobiales* (*Bradyrhizobium sp.*). Наиболее устойчивыми к загрязнению оказались представители *Sphingomonadales*, *Rhodospirillales* (*Azospirillum sp.* и *Phaeospirillum sp.*) [19].

1.2 Методы очистки окружающей среды от загрязнения углеводородами нефти

Разливы нефти приводят к негативному воздействию на окружающую среду, экономику и общество в целом. Для решения проблем, связанных с загрязнением окружающей среды нефтью и нефтепродуктами, человечество разрабатывает эффективные методы утилизации нефтяных загрязнений. Существуют различные восстановительные технологии для обработки почвы, загрязненной различными углеводородами, в том числе дизельным топливом, нефтью, нефтепродуктами, смазочными маслами, битумом и бункерным топливом. Современные методы включают экстракцию растворителем, биоремедиацию, фиторемедиацию, химическое окисление, электрокинетическую рекультивацию, тепловые технологии, ультразвуковую, флотационную и интегрированные технологии восстановительных работ [20].

В связи с увеличением площадей земель, загрязненных нефтью и ее компонентами, проблема охраны почв приобретает все большее значение. Вопросам реабилитации природных объектов уделяется особое внимание, в частности, разрабатываются различные методы очистки и восстановления биологической активности почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. Наиболее перспективным направлением ремедиации нефтезагрязненных объектов является применение биологического метода, основанного на потенциале почвенных микроорганизмов трансформировать поллютанты различного состава и происхождения - биоремедиация. В последние годы наблюдается растущий интерес к методам биоремедиации, потому что они являются эффективными, дешевыми и экологически чистыми способами защиты окружающей среды [21, 22].

Часто процесс самоочистки среды не является достаточным, и необходимо применять дополнительные процедуры и различные субстраты и препараты, поддерживающие процесс биологической очистки. Сегодня биоинженерия предлагает множество решений, которые позволяют эффективное проведение биологической рекультивации, в том числе биостимуляцию и биоаугментацию. Для этого используют различные органические вещества, сорбенты, микробиологические и ферментные препараты, химические вещества природного происхождения или наночастицы. Важно, чтобы используемые субстраты или продукты не оказывали отрицательного воздействия на окружающую среду и легко подвергались биодegradации [22].

1.2.1 Фиторемедиация нефтезагрязненных почв

Фиторемедиация (фитобиоремедиация) представляет собой использование растений и ассоциированных с ними микроорганизмов для очистки окружающей среды. В этой технологии используются природные процессы, с помощью которых растения и ризосферные микроорганизмы

деградируют и накапливают различные поллютанты [23, 24, 25]. В последнее время в лабораториях проводятся масштабные исследования различных видов растений, которые могут быть использованы в рекультивации загрязненных нефтью почв [20]. В Таблице 1 представлены недавние результаты, полученные при исследованиях в области фиторемедиации.

Таблица 1 – Фиторемедиация нефтезагрязненных почв (адаптировано из статьи Lim M. W. и др.) [20]

Тип растения	Виды растения	Загрязнитель	Предельная концентрация загрязнителя	Длительность процесса ремедиации	Максимальная эффективность удаления, %
Декаративное растение	<i>Mirabilis jalapa</i> L.	Нефть	5 г/кг	127 дней	63,2
Бобовые и злаковые культуры	<i>Calopogonium mucunoides</i> , <i>Centrosema brasilianum</i> , <i>Stylosanthes capitala</i> , <i>Brachiaria brizantha</i> , <i>Cyperus aggregatus</i> , <i>Eleusine indica</i>	Сырая нефть	5% от веса	180 дней	57.69 (<i>Eleusine indica</i>)
Сосна, тополь, злаковые и бобовые смеси	<i>Pinus sylvestris</i> , <i>Populus deltoids</i> , <i>Festuca rubra</i> , <i>Poa pratensis</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Trifolium repens</i> , <i>Pisum sativum</i>	Дизель	0,5% от веса	180 дней	67-74 (для бобовых)
Очерет, люцерна	<i>Phragmites australis</i> , <i>Medicago sativa</i>	Битум	79,7 г/кг	27 месяцев	82 (тростник)
Несъедобные растения	<i>Jatropha curcas</i>	Смазочное масло	1% от веса	180 дней	67,3
Сельскохозяйственные культуры, дикорастущие травы, бобовые культуры	<i>Triticum aestivum</i> L., <i>Secale cereale</i> L., <i>Avena sativa</i> L., <i>Hordeum vulgare</i> , <i>Sorghum bicolor</i> L. Moench, <i>Panicum miliaceum</i> L., <i>Zea mays</i> L., <i>Lolium perenne</i> L., <i>Bromopsis inermis</i> , <i>Agropyron cristatum</i> L., <i>Agropyron tenerum</i> L., <i>Festuca pratensis</i> Huds., <i>Medicago sativa</i> L., <i>Trifolium pratense</i> L., <i>Onobrychis antasiatica</i> Khin	Нефтяной шлам	15.6 г/кг	72 дня	52 (рожь)
Несъедобные растения	<i>Hibiscus cannabinus</i>	Смазочное масло	1% от веса	90 дней	91,8

Окончание таблицы 1

Тип растения	Виды растения	Загрязнитель	Предельная концентрация загрязнителя	Длительность процесса ремедиации	Максимальная эффективность удаления, %
Ивовое насаждение	<i>Salix viminalis L.</i>	Минеральное масло и ПАУ	245,2 мг/кг	1,5 года	57
Высокая трава	<i>Festuca arundinacea</i>	Нефть	50 г/кг	120 дней	50
Соя, зеленая фасоль, подсолнечник, Индийская горчица, разнотравье, кукуруза, клевер	<i>Glycine max</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Helianthus annuus</i> , <i>Brassica juncea</i> , <i>Zea mays</i> , красный клевер, <i>Trifolium pratense</i> /клевер белый горный, <i>Trifolium repens</i>	Моторное масло	1,5 от веса	150 дней	100
Люцерна, тростник	<i>Medicago sativa</i> , <i>Phragmites australis</i>	Битум	79,7 г/кг	27 месяцев	82
Тропические пастбищные травы	<i>Brachiaria brizantha</i>	Сырая нефть	5% от веса	22 недели	18,4
Злаки, инфицированные эндофитами, и без них	<i>Festuca arundinacea</i> Schreb., <i>Festuca pratensis</i> Huds.	Нефть	4700 мг/кг	7 месяцев	72 (травы с эндофитами)
Несъедобные растения	<i>Dracaena reflexa</i> с внесением 5% органических отходов	Дизель	1% от веса	270 дней	99
Райграс	<i>Lolium perenne L.</i>	Дизель	50 г/кг	90 дней	57,3
Солончаковые растения	<i>P. australis</i>	Лёгкая аравийская сырая нефть	5 мл/л	150 дней	16
-	<i>Pinus densiflora</i> , <i>Thuja orientalis</i> , и <i>Populus tomentiglandulosa</i> с внесенным микробным консорциумом	Дизель	6000 мг/кг	150 дней	86,8
Черное мангровое дерево	<i>Avicennia schaueriana</i>	Лёгкая парафинистая нефть	32,2 мг/г	90 дней	87
Травяной куст	<i>Bassia scoparia</i> (L.) A. J. Scott (Chenopodiaceae)	Сырая нефть	40 г/кг	5 месяцев	До 57,7

Технология фиторемедиации почвы, загрязненной нефтью, достаточно проста в применении. Она складывается из нескольких этапов [26, 27]:

1) оценка характера загрязнения участка (химический состав разлива, степень проникновения нефти в почву, картирование);

2) разработка оптимальной схемы фиторемедиации (подбор видового состава растений, которые оптимальным образом подходят для устранения данного типа загрязнения и соответствуют данным почвенно-климатическим условиям, определение схемы посадки, выбор необходимых агротехнических мероприятий, в том числе оптимизация питания и химическая защита растений);

3) выращивание растений (проведение комплекса агротехнических мероприятий, в том числе подготовка семенного материала, подготовка почвы, внесение минеральных удобрений, использование средств защиты);

4) мониторинг участка (определение концентрации и распространения химических компонентов нефти, отслеживание путей биodeградации нефти, проведение информационного анализа и прогнозирования).

Фиторемедиация применяется прямо в районе загрязнения, способствует снижению затрат и уменьшению контакта загрязнённого субстрата с людьми и окружающей средой. Фиторемедиация получила одобрение у широкой общественности как экологически чистая технология, альтернативная различным химическим и физическим методам.

1.2.2 Биоремедиация нефтезагрязнённых почв с помощью микроорганизмов

Процесс биоремедиации рассматривают как способ, с помощью которого возможно ускорить естественный процесс деградации нефти. Основными факторами, которые влияют на применение данного метода, являются погодные условия, характеристика загрязняющего вещества, свойства почвы и эксплуатационная обстановка. Также на эффективность биоремедиации влияет концентрация углеводородокисляющих микроорганизмов, наличие в почве таких питательных веществ как растворенный кислород, азот и фосфор [19].

Выделяют три основных механизма, способствующих эффективной биоремедиации: биоаугментация, биостимуляция и биоентилирование. Согласно современным исследованиям биоремедиация демонстрирует высокий потенциал для успешной рекультивации загрязненной нефтепродуктами почвы. Таблица 2 показывает обобщенное представление в области исследований биоремедиации на сегодняшний день в рекультивации загрязненных нефтью почв [20].

Таблица 2 – Биоремедиация нефтезагрязненных почв (адаптировано из статьи Lim M. W. и др.) [20]

Тип обработки	Составляющие обработки	Загрязнитель	Предельная концентрация загрязнителя	Длительность процесса ремедиации	Максимальная эффективность удаления, %
Удобрение	Олеофильное удобрение	Нефть	2500 мг / кг	38 дней	80
Микроорганизмы и удобрения	Бактериальный консорциум и смесь питательных веществ	Сырая нефть	10 % от веса	18 месяцев	99,9
Растворимые и медленно высвобождающиеся удобрения	Гранулированный нитрат аммония, суперфосфат, сульфат железа, дрожжевой экстракт, Inipol SP1	Топливо IF-30	До 6 %	7 дней	89,3
Микроорганизмы и удобрения	Микробный консорциум (<i>Nocardia nova</i> & <i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>dairenensis</i>); инокулят, питательные вещества	Тяжелая нефть	5,4%	41 день	7,4
Биополимеры и удобрение	Хитозан и осмокот	Лёгкая аравийская сырая нефть (ALCO)	3,5% от веса	56 дней	99,7
Биосуфрактант	PES-51	выветрившаяся нефть	100 мг/г	3 месяца	70
Удобрения	Бактериальный консорциум, неорганические питательные вещества (нитрат аммония и дикалийфосфат водорода), компост и наполнитель (пшеничные отруби)	Шлам НПЗ	5% от веса	90 дней	76
Коммерческий продукт	OSEP® (Oil Spill Eater International Corp.)	Дизельное топливо	10,336 мг/кг	45 дней	49,4

Окончание таблицы 2

Тип обработки	Составляющие обработки	Загрязнитель	Предельная концентрация загрязнителя	Длительность процесса ремедиации	Максимальная эффективность удаления, %
Металлы	Cd, Cu, Pb	Лёгкая аравийская сырая нефть	<26мг/г	15 дней	32
Биосуфрактант	Гуаровая камедь	Дизельное топливо	4600 мг/кг	12 недель	82
Воздушный поток	Кислород	В20 (80% дизельного топлива, 20% биодизель)	4% от веса	>60 дней	85
Микроорганизмы и удобрения	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AS03, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> N108, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> N002, <i>Achromobacter xylooxidans</i> N78	Сырая нефть	2% от объема	24 недели	80
Удобрения	NH ₄ Cl и NaH ₂ PO ₄	Аравийская нефть	55.2 ppm	63 дня	9,6
Биосуфрактант	<i>Paenibacillus dendritiformis</i> CN5	Моторное масло	20% от веса	24 часа	81
Органические отходы	Жом сахарного тростника и безмасличные плоды масличной пальмы, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UKMP-14T и <i>Acinetobacter baumannii</i> UKMP-12T	Сырая нефть	3% от объема	20 дней	100
Микробные инокуляты	<i>Pseudoallescheria sp.</i> , смесь лигноцеллюлозы	Нефть	5 г/л	60 дней	79,7
Микробные инокуляты	<i>S. saprophyticus</i> UFPEDA 800 и <i>S. marcescens</i> UFPEDA 83, дрожжи <i>R. aurantiaca</i> UFPEDA 845 и <i>C. ernobii</i> UFPEDA 862	Дизель	10% от объема	7 дней	69
Микробный консорциум	<i>Burkholderia cepacia</i> GS3C, штаммы <i>Sphingomonas</i> GY2B и <i>Pandora</i> <i>pnomenusa</i> GP3B	Сырая нефть	5000мг/кг	40 дней	64,4

Ведущая роль в трансформации и минерализации органических ксенобиотиков принадлежит хемоорганотрофным (гетеротрофным) микроорганизмам, синтезирующим разнообразные ферментные системы. Значительную роль в процессах очистки почв от нефти играют бактерии. Поскольку представители микрофлоры обладают высокой метаболической активностью, то, очевидно, что данная форма жизни способна быстро ликвидировать загрязнение. Поэтому в настоящее время все больше внимания

уделяется исследованию методов рекультивации основанных на применении чистых или смешанных культур микроорганизмов [1, 28, 29].

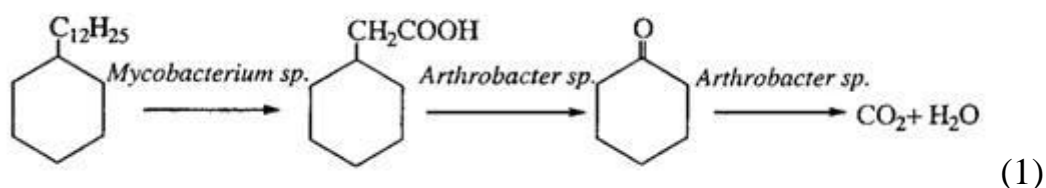
По скорости разложения разных классов углеводородов наиболее интенсивно этому процессу подвергаются алифатические углеводороды, а нафтеновые и ароматические соединения разлагаются намного медленнее. В природных процессах биодegradации большое значение имеют условия окружающей среды, в частности, концентрация солей, интенсивность освещения, содержание биогенных элементов в субстрате, температура, аэрация [30]. Образование эмульсии из воды и нефти заметно замедляет разложение в связи с образованием анаэробных условий. Поэтому наибольшая часть микробиологического разложения происходит на поверхности почвы [28].

От физиологических особенностей каждого рода микроорганизмов зависит направленность процесса деструкции индивидуальных углеводородов и их смесей, обладающих различной степенью устойчивости к окислению (табл. 3) [31].

Таблица 3 – Классификация компонентов нефти по их способности к биодegradации [32]

Группа	Отношение к воздействию микроорганизмов	Степень дегradации, % к исходн. содержанию	Компоненты нефти
I	Высокочувствительные	80-100	н-алканы; изо-алканы
II	Чувствительные	60-80	цикланы с 6, 1, 5 и двумя кольцами; S-ароматика; Моноароматика
III	Умеренно чувствительные	45-60	циклоалканы с 3 и 4 кольцами; триароматические УВ
IV	Устойчивые	30-45	тетраароматические УВ; стераны; тритерпаны; нафтеноароматические УВ
V	Высоко устойчивые	0-35	Пентаароматические УВ; асфальтены; смолы

Смешанные популяции, как правило, быстрее и полнее разрушают многие синтетические соединения. Это характерно для ситуации, когда отдельный вид организмов трансформирует одно соединение в другое, но не имеет ферментативной системы для его дальнейшей деградации [33]. Этой способностью обладает другой организм, в результате соединение разлагается полностью, например, додецилциклогексан (1)



При исследовании биodeградации трициклического ароматического углеводорода фенантрена учеными установлено, что наименьшая концентрация загрязнителя достигается при использовании одного штамма *Sphingobium sp.*, а не фенантренразрушающего консорциума. Также исследования показали, что инокуляция данной бактерии вызывает более радикальные изменения в микробном сообществе, чем инокуляция консорциума [34].

Полихлорированные соединения могут быть дехлорированы смешанными культурами, состоящими из аэробных и анаэробных микроорганизмов [1].

Существуют различные подходы и пути биodeградации углеводородов нефти:

- стимуляция естественной нефтеокисляющей микрофлоры в почвах и водоёмах;
- интродукция активных УВОМ;
- использование иммобилизованных клеток на различных субстратах и создание на их базе биопрепаратов.

Учитывая способы получения биологических объектов - деструкторов ксенобиотиков, возможны два варианта биоочистки и биоремедиации. Первый вариант – для участков с застарелыми загрязнениями, где почти всегда обитает

дикая, аборигенная микрофлора, способная их трансформировать. Такие загрязнения можно удалять *in situ* (по месту) без внесения биопрепаратов. При этом биодegradация лимитируется факторами окружающей среды и свойствами загрязнения, такими как содержание кислорода в среде, растворимость вещества-загрязнителя и др. Второй вариант – предварительно получают биологически активный штамм, накапливают жизнеспособные клетки, которые вносят в виде биопрепарата в загрязненную среду. Этот вариант целесообразно применять в северных регионах и при обработке мест с незастарелыми загрязнениями [1, 35].

На сегодняшний день отсутствуют экспериментальные данные относительно окисления углеводов внеклеточными ферментами микроорганизмов [31]. Специальные исследования показали, что при развитии в среде с гексадеканом дрожжей р. *Candida* ферменты, ответственные за окисление углеводов, а также продукты первичного окисления субстрата – цетиловый спирт и пальмитиновый альдегид – содержались только в клетках и не были обнаружены в культуральной среде. Имеющиеся разнообразные данные о поступлении углеводов в клетки микроорганизмов, локализации углеводородокисляющих ферментов и образующихся продуктов не оставляют сомнений в том, что углеводороды окисляются внутриклеточно [36].

Важным вопросом, решение которого необходимо для понимания закономерностей и механизма биоразрушения углеводов, является выявление и идентификация углеводородокисляющих микроорганизмов. В почвах УВОМ представлены, в основном, бактериями и грибами. Описано 22 рода бактерий, 19 родов дрожжей и 24 рода микроскопических мицелиальных грибов. Типичными обитателями почв являются бактерии родов *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Brevibacterium*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacteriaceae*, *Mycobacterium*, *Beierinckia*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Xanthomonas* и др. Среди углеводородокисляющих микроорганизмов особенно активно ведут

деструкцию следующие рода бактерий: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Micobacterium* [16, 37].

В настоящее время разработаны новые биопрепараты, которые применяются в различных очистительных мероприятиях. Согласно исследованиям А. С. Григориади, при загрязнении нефтью происходит общее снижение окислительно-восстановительного потенциала почвы в сторону восстановительных процессов, что обуславливается снижением аэрации почв, закупоркой пор, склеиванием структурных отдельностей, увеличением органического вещества. Внесение углеводородокисляющего препарата Универсал способствует положительной динамике развития групп микроорганизмов, которые участвуют в деградации нефтяных углеводородов. Биопрепарат «Универсал» способствует увеличению окислительно-восстановительных процессов в сторону окислительных процессов, что способствует восстановлению почвенных процессов [21].

Для изучения эффективности применения биопрепаратов на территориях нефтезагрязненных земель и шламов учеными были поставлены полевые эксперименты на полигонах биоремедиации земель Кононако 20 и Кононако 26 в группе Аука, EP PETROECUADOR. В настоящее время в компании «Петроэквадор» широко используются методы биоремедиации нефтезагрязненных территорий с использованием препаратов на основе консорциумов углеводородредуцирующих бактерий. Применение биопрепарата БИОЛ позволило получить высокую степень очистки нефтезагрязненных грунтов, степень биоразложения углеводородов составила от 88,88 до 96,87 %, общее количество обезвреженных грунтов – 3196,49 м³. Очищенная почва была использована для засыпки ликвидированных амбаров и посева некоторых сортов деревьев: бальса, тика, а также травяных культур [38].

М.В. Ахмадиев провел работу по оценке эффективности применения биопрепарата на основе аборигенных штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов, выделенных из нефтезагрязненной почвы, и установил, что при внесении биопрепарата на основе аборигенных культур биодеструкция

углеводородов нефти Бугурусланского месторождения микроорганизмами происходила непосредственно после внесения биопрепарата в нефтезагрязненную почву, без временных затрат на адаптацию культур к актуальному фракционному составу нефтепродуктов. Автор отмечает, что преимуществом внесения биопрепарата на основе аборигенных культур является предотвращение биоценотического загрязнения почвы, так как при применении аборигенных культур УВОМ в процессе биоремедиации происходит восстановление естественных биоценозов и нефтезагрязненные почвы постепенно приближаются к фоновым показателям незагрязненных природных почв. Также М.В. Ахмадиевым проделана микроскопия в процессе подготовки биопрепарата, которая показала, что постепенно происходит процесс разрушения нефти и ее ассимиляция микроорганизмами (рис. 1, б), в то время как в варианте опыта без внесения УВОМ биодegradации нефти не происходило (рис. 1, а) [39].

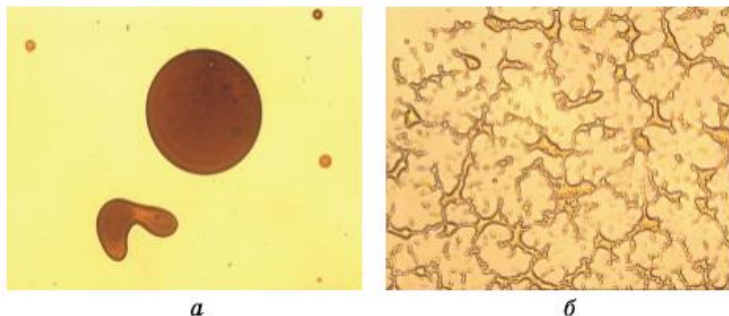


Рисунок 1 – Микроскопическая картина разрушения сырой нефти микроорганизмами ($\times 800$): а – контрольный вариант без внесения УВОМ; б – вариант с внесением УВОМ (М.В. Ахмадиев)

В лабораторном эксперименте М. Расва-Плосинiczака, G. Anna Плазab и Z. Piotrowska-Segeta установили, что консорциум из *B. subtilis* и *Pseudomonas sp.* имел большой потенциал для повышения биоремедиации нефтезагрязненных почв, чем эти штаммы в отдельности. Ученые отметили, что какие-либо изменения в структурном разнообразии бактериальных сообществ в почвах при инокуляции штаммов не происходили. При этом наблюдались сдвиги в области генетического разнообразия общего числа бактериальных сообществ и

сообществ, которые имели гены, участвующие в деградации углеводов. Также наблюдалось увеличение числа копий гена *alkB*, усиление метаболической активности и изменения в использовании отдельных субстратов в обработанной нефтью почве [40].

G.A. Silva-Castro со своими коллегами проводила исследования деградации углеводов автохтонными микроорганизмами в песчаной почве искусственно загрязненной дизельным топливом, эксперименты проводились в лабораторных условиях при различном содержании влаги. Согласно результатам, влажность почвы играет важную роль для процессов биоремедиации, а наилучшим методом для стимуляции автохтонного сообщества является внесение N, P, K удобрений [41].

1.2.3 Биодеструкция углеводов плазмидосодержащими штаммами

Индийские ученые доказали, что за деградацию углеводов плазмидная и хромосомная ДНК отвечают в равной степени, так как при потере плазмидной ДНК способность к разрушению многих фракций поллютантов не утрачивается [42].

Согласно работам А.А. Ветровой, штаммы углеводородокисляющих бактерий, а именно *Acinetobacter baumannii*, *Serratia sp.*, *Rhodococcus erythropolis* содержат катаболические плазмиды, которые расширяют спектр утилизируемых субстратов клетки-хозяина. Известно, что гены, кодирующие ферменты, расщепляющие циклические углеводороды (такие как толуол, камфора, салицилат, нафталин), находятся в составе бактериальных плазмид [43].

Также А.А. Ветрова установила, что наибольшая убыль гексановой фракции при температуре 24°C наблюдается у штаммов *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus sp.*, *Serratia sp.* и *Acinetobacter baumannii*. В этих же

условиях бактерии *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas putida* эффективно разлагают асфальтено-смолистые компоненты нефти. При температуре 24°C бактерии рода *Pseudomonas* также эффективно разлагают углеводороды бензольной фракции. При пониженной положительной температуре способность к деградации бензольно-спиртовой фракции отмечалась у микроорганизмов *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus sp.*, *Serratia sp.* и *Acinetobacter baumannii*, а у другого штамма р. *Acinetobacter* была выявлена способность к деструкции в первую очередь лёгких фракций нефти и твёрдых парафинов [44].

Исследователями показано, что в сайтах, загрязненных нефтепродуктами, происходит увеличение популяции микроорганизмов, содержащих катаболические плазмиды. В ЛБП ИБФМ РАН показано широкое распространение плазмид среди штаммов *Pseudomonas*, контролирующих деградацию полициклических ароматических углеводородов [45]. Конъюгативные плазмиды деградации углеводородов при интродукции в загрязненный сайт бактерий, содержащих эти плазмиды, способны распространяться среди аборигенных микроорганизмов.

Установлено, что длительное культивирование в богатой среде микроорганизмов *Pseudomonas putida* приводит к появлению в популяциях бесплазмидных вариантов. У полученных элиминантов отсутствует способность к деградации нафталина и гексадекана [11].

При загрязнении среды нефтью, дизельным топливом, ВТЕХ, бензином, диоктилфталатом изменяется микроценоз. Что касается динамики бактериальных сообществ, можно предположить, что чаще всего доминируют протеобактерии, а в местах, где основным поллютантом является нафталин, в большинстве случаев, с течением времени в популяции начинают преобладать актинобактерии, постепенно замещая протеобактерий. При этом, в утилизации нафталина существенную роль играют плазмиды, содержащие гены утилизации этого соединения [46, 47, 48, 49].

1.2.4 Влияние микроорганизмов на процессы фиторемедиации окружающей среды от органических загрязнителей

Использование микроорганизмов является одним из наиболее многообещающих путей повышения эффективности фиторемедиации. Известно, что существование растений очень тесно связано с жизнедеятельностью микроорганизмов. Различные органы растений формируют вокруг себя специфические экологические ниши для обитающих внутри или на их поверхности бактерий и грибов. Положительное влияние микроорганизмов на растения давно используется в сельском хозяйстве для увеличения урожая, повышения пищевых и кормовых качеств сельскохозяйственных культур. Однако интенсивное изучение возможности применения микроорганизмов при фиторемедиации объектов окружающей среды началось относительно недавно [50].

Влияние микроорганизмов на фиторемедиацию условно можно разделить на прямое (участие в деструкции загрязнителей и их усвоение растениями) и косвенное (изменение чувствительности растений к загрязнению).

Многими исследованиями установлено положительное влияние микробно-растительных комплексов на очистку окружающей среды от полициклических ароматических углеводородов, синтетических поверхностно активных веществ, нефти, хлорорганических, нитроароматических и фосфорорганических соединений, а также от других ксенобиотиков [50]. Отсутствие влияния или даже замедление разложения ряда природных веществ или ксенобиотиков в присутствии растений указывается в относительно небольшом количестве литературных источников.

Существуют следующие объяснения воздействия микробно-растительных систем на рекультивацию загрязненных биоценозов [50]:

- повышение численности микроорганизмов под влиянием растений;
- стимуляция микробной активности в ризосфере;
- влияние микроорганизмов на процесс фитодеградации и фитотрансформации;

- влияние микроорганизмов на поступление органических загрязнителей в растения.

В.П. Шабаетым установлено, что внесение ростстимулирующих ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* существенно уменьшает негативное влияние на рост культурных растений загрязнения почв нефтью. Причем, согласно его результатам, применение бактерий на нефтезагрязненных почвах не уступает по эффективности сорбенту, состоящему из гидролизного лигнина [51].

Растения совместно с эндофитными бактериями обладают огромным потенциалом для рекультивации почв, загрязненной углеводородами. Особенность колонизации и активность эндофитов в ризосфере и эндосфере растения хозяина являются одними из основных факторов, которые могут повлиять на процесс фиторемедиации [52, 53, 54]. Растения формируют нишу и продуцируют питательные вещества, которые необходимы для эндофитных бактерий, в то время как эти бактерии улучшают рост растений, так как они снабжают растения своими метаболитами или же разрушают загрязняющие вещества, которые могут оказывать токсическое действие на макроорганизм хозяина. Показано, что важным критерием для эффективного процесса фиторемедиации является успешная колонизация эндофитными углеводородокисляющими бактериями корней растений [55, 56, 57].

Исследователи Института биохимии и физиологии микроорганизмов (Пушино) доказали, что консорциум бактерий *Rhodococcus erythropolis* S26, *Acinetobacter baumannii* 1B, *Acinetobacter baumannii* 7 и *Pseudomonas putida* F701 является эффективным деструктором нефти, а также он быстро колонизирует корни ячменя [58]. Ученые Национального института биотехнологии и генетической инженерии (Пакистан) исследовали штаммы углеводородокисляющих бактерий *Pseudomonas aeruginosa* BRRI54 (выделен с корней *Brachiaria mutica*) и *Acinetobacter sp.* BRSI56 (выделен с побегов *Brachiaria mutica*) на способность к колонизации растений *Brachiaria mutica* и *Leptochloa fusca* при нефтяном загрязнении. Исследователями установлено, что

данные растения и микроорганизмы имеют потенциал для рекультивации почв, загрязненной нефтью [59].

2 Объекты и методы исследования

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования в настоящей работе являлись штаммы углеводородокисляющих бактерий, выделенных из образцов почв, отобранных в районе Академгородка (г. Красноярск) и в районе Ванкорского нефтегазового месторождения (Туруханский район).

В качестве фиторемедианта был выбран эспарцет песчаный – *Onobrychis arenaria* (Kit.) DC., принадлежащий к семейству бобовых *Fabaceae* Lindl. Этот вид является ценным кормовым растением, имеет широкое распространение и применяется в фиторемедиации [60].

2.2 Методы выделения микроорганизмов

Для выделения углеводородокисляющих бактерий получали накопительные культуры на жидкой минеральной среде следующего состава (г/л): NaNO_3 – 3,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; KCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; вода водопроводная [61]. В конические колбы со 100 мл минеральной среды вносили 1 мл нефти и добавляли 1 г почвы. Инкубировали при 30°C в шейкере-инкубаторе JEIO TECH SL-600 (Корея) в течение 7 суток. Затем выделяли чистые культуры бактерий, высевая их на агаризованную питательную среду (Nutrient agar, HiMedia).

Для выделения углеводородокисляющих бактерий, способных использовать нефть в качестве единственного источника углерода, использовали метод посева на агаризованную минеральную среду с добавлением нефти (г/л): NaNO_3 – 3,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; KCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; агар – 18; вода водопроводная. После посева суспензии микроорганизмов на поверхность среды наносили 1 мл стерильной

нефти и распределяли шпателем. Так как помимо использования углеводов в качестве единственного источника углерода бактерии могут использовать CO₂, параллельно проводили посев на минеральную среду без добавления нефти. Культивировали при температуре 30°C. Рост бактерий фиксировали через 3 суток, изолированные колонии отсевали на скошенный агар (МПА).

2.3 Методы идентификации микроорганизмов

Идентификацию микроорганизмов проводили методом МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии. Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex («BrukerDaltonics», Германия).

Исследуемые бактерии в чистой суточной культуре снимали одноразовой петлей с поверхности скошенного агара и наносили непосредственно (растирали) на лунки стального планшета для MALDI-TOF масс-спектрометрии (MTP 384 massive, «BrukerDaltonics», Германия). Затем на образцы наносили по 2 мкл насыщенного раствора матрицы - α -CHCA («BrukerDaltonics», Германия) в растворе, содержащем 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты. Планшет с содержимым высушивали на воздухе до образования кристаллов (5 мин). В качестве контрольного образца, а также в качестве внешнего калибратора использовался экстракт штамма *E. coli* DH5a.

Для получения каждого масс-спектра использовали 50 импульсов лазера с мощностью излучения, установленной на уровне минимального порогового значения, достаточного для десорбции-ионизации образца. Параметры масс-спектрометра оптимизировали для диапазона m/z (отношение массы к заряду) от 2000 до 20 000. Внутреннюю калибровку указанного диапазона проводили с использованием точных значений масс известных белков *E. coli*. Образец наносили на три ячейки планшета, для каждой из которых записывали спектр, полученный в результате суммирования 10 одиночных спектров (500 импульсов лазера). Для записи, обработки и анализа массспектров

использовали программное обеспечение фирмы «BrukerDaltonics» (Германия): flexControl 2.4 (Build 38). Идентификация бактерий проводилась автоматически, с использованием программного обеспечения.

При интерпретации масс-спектров исходили из предположения, что большая часть регистрируемых пиков соответствует белковым молекулам, а определяемые массы - массам целых (не фрагментированных) белков.

2.4 Методы исследования влияния углеводородокисляющих бактерий на ризосферную микрофлору эспарцета песчаного

Изучение возможности совместного применения эспарцета песчаного с углеводородокисляющими бактериями для биоремедиации нефтезагрязненной почвы проводили в лабораторных условиях (опыты I и II) и на натурном эксперименте (опыт III).

Опыт I. В пластиковые контейнеры объемом 1 л вносили смесь почво-грунта «Рассадный Гарант» с песком в соотношении 1:1 массой 450 г или песок массой 800 г. Предварительно песок был промыт и просушен в сушильном шкафу при температуре 110°C. Во все контейнеры было внесено минеральное удобрение «Нитрофоска» (0,5 г). В качестве загрязнителя в почво-грунт было внесено 11 мл нефти, а в песок 20 мл, контрольные варианты – субстраты без внесения нефти.

Затем в контейнеры внесли суспензию углеводородокисляющих микроорганизмов, выделенных из почв г. Красноярска, в объеме 25 мл, титр суспензии – $5,6 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл [62]. Через неделю после внесения нефти и микроорганизмов контейнеры засеивали семенами эспарцета по 50 семян исследуемого вида. Эксперимент длился 21 день при комнатной температуре (20-25 °C) и естественном освещении. Через 16 суток анализировали структуру микробиоценоза в ризосфере эспарцета.

Данные по остаточному содержанию нефти были любезно предоставлены сотрудниками Центра коллективного пользования СФУ.

Опыт II. Образцы почвы, отобранные в районе Ванкорского нефтегазового месторождения, распределяли по 300 г в пластиковые контейнеры объемом 1 л и вносили в каждый контейнер 15 мл нефти. В качестве положительного контроля в контейнер с почвой вносили только нефть, отрицательный контроль – почва без добавления нефти и бактерий.

Затем в каждый контейнер засевали семена эспарцета и одновременно вносили по 42 мл суспензии одного из шести штаммов нефтеокисляющих бактерий, выделенных из нефтезагрязненных почв Туруханского района. В один из контейнеров вносили смесь всех вышеперечисленных штаммов. Титр суспензии составлял $2,8 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл; инфекционная нагрузка – $4 \cdot 10^5$ клеток в 1 г почвы. Эксперимент проводили при комнатной температуре (20-25 °С) и естественном освещении. Ризосферные бактерии анализировали через 16 суток.

Опыт III. Натурный эксперимент. Опытный участок площадью 5×5 м с естественной флорой, преобладающими видами которой были травянистые растения, был выделен в районе поселка Новокаргино, Енисейского района. На площадке выделяли экспериментальные участки в виде конверта, 50 на 50 см. На каждую из соответствующих площадок было внесено по 50 мл нефти, суспензии всех шести штаммов нефтеокисляющих бактерий и затем высеяны семена эспарцета песчаного по 50 штук. Ризосферную микрофлору эспарцета анализировали через месяц. Контрольный вариант – необработанная почва.

2.5 Методы исследования ризосферной микрофлоры

Для определения общего количества ризосферных микроорганизмов применяли метод посева на плотные питательные среды.

Для выделения аммонифицирующих бактерий использовали МПА – мясопептонный агар (Nutrient agar, HiMedia), для выделения прототрофных бактерий – крахмало-аммиачный агар (КАА) следующего состава (г/л): растворимый крахмал – 10,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0;

NaCl – 1,0; CaCO₃ – 3,0; агар – 15; вода водопроводная – 1л. Для выделения аэробных азотфиксаторов и олигонитрофилов использовали бактерий среду Эшби следующего состава (г/л): маннит 20; K₂HPO₄ – 0,2; MgSO₄·7H₂O – 0,2; NaCl – 0,2; K₂SO₄ – 0,1; CaCO₃ – 5,0; агар – 20. Микромицеты выделяли на агаре Сабуро (Sabouraud Agar, HiMedia). Культивировали при температуре 30°C. Подсчет бактерий на МПА производили через двое суток, а на остальных средах через 7 суток. Коэффициенты минерализации рассчитывали как отношение численности прототрофов (КАА) и аммонификаторов (МПА).

2.6 Выделение плазмидной ДНК из клеток бактерий

Выделение плазмид осуществляли с помощью коммерческого набора ISOLATE II PlasmidMiniKit (Bioline, USA). Процесс выделения плазмидной ДНК с использованием PlasmidMiniKit предусматривает щелочной лизис, очищение лизата и последующее специфическое связывание плазмидной ДНК с мембраной выделительной колонки. Промыванием избавляются от загрязняющих примесей. Далее плазмидная ДНК элюируется с мембраны колонки.

Для получения биомассы готовили 200мл минеральной среды с добавлением стерильной нефти или глюкозы для каждого штамма. Бактерии культивировали в течение суток, затем отбирали 5 мл и центрифугировали в течение 30 с. при 11000 об/мин., удаляли супернатант. Полученную биомассу отмывали физиологическим раствором. Для разрушения клеточных оболочек добавляли 250 мкл буфера P1 и ресуспендировали пипетированием, далее добавляли 250 мкл лизирующего буфера P2 и аккуратно перемешивали, переворачивая пробирку 6-8 раз. Затем добавляли 300 мкл нейтрализационного буфера и также аккуратно перемешивали. Получившуюся смесь центрифугировали 5 мин. при 11000 об/мин. Переносили супернатант в специальные колонки, предоставленные набором, где происходит связывание молекул ДНК. Центрифугировали 1 мин. при 11000 об/мин. Следующим шагом

промывали силика-мембрану, используя 500 мкл промывочного буфера PW1, и центрифугировали 1 мин при 11000 об/мин., для сушки силика-мембраны центрифугировали еще 1 мин. при 11000 об/мин. Для элюирования ДНК добавляли 50 мкл элюирующего буфера Р и инкубировали при комнатной температуре 1 мин., далее центрифугировали 1 мин. при 11000 об/мин. В итоге получили очищенный образец плазмидной ДНК.

Используя спектрофотометр SmartSpecPlus (Bio-Rad), определили количество и качество полученной ДНК у выделенных штаммов. Для определения количества задавали коэффициент пересчета 50мкмоль/мл в расчете на 1 о.е., для определения качества – отношение A_{260} к A_{280} . Электрофорез проводили только для ДНК тех штаммов, у которых коэффициент качества составил от 1,8 до 2.

Для проведения горизонтального электрофореза готовили пластину агарозного геля, представляющей собой застывшую после расплавления в электрофорезном трис-боратном буфере агарозу в концентрации 1%. При заливке с помощью гребенки формировали в геле специальные лунки, в которые, после затвердевания геля, вносили буфер для нанесения образцов (содержит сахарозу и ксиленцианол) (производства предприятия ПанЭКО, Москва) перемешаны с образцами ДНК. Далее пластину геля помещали в аппарат для горизонтального гель-электрофореза Mini-SubCell GT (Bio-Rad) и подключали источник постоянного напряжения Bio-RadPowerPac. Электрофорез проводили при - 85V в течение 2ч. По окончании разделения подложку с гелем извлекали из кюветы и помещали гель вместе с подложкой в красящий раствор (0,5мг/л бромистого этидия, 20мин). После прокрашивания гель промывали в воде в течение 2 мин и переносили подложку в камеру трансиллюминатора гель-документирующей системы Bio-RadGelDoc XR с компьютером, излучающего свет в ультрафиолетовом диапазоне. Для определения размера плазмидной ДНК использовали маркеры молекулярной массы ДНК (маркер 1000 bp и ДНК фага λ производства НПО "СибЭнзим" Новосибирск).

3 Результаты исследования

[Изъято 13 страниц]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проделанной работы были следующие выводы:

1. Из почвы в Академгородке г. Красноярска были выделены и идентифицированы семь штаммов бактерий, устойчивых к загрязнению нефтепродуктами, пять из которых способны использовать нефть в качестве единственного источника углерода.
2. Из почв Туруханского района выделены шесть штаммов, устойчивых к загрязнению нефтепродуктами.
3. В результате скрининга была обнаружена плазмидная ДНК у штамма, выращенного на минеральной среде с добавлением нефти, размер которой составил более 50000 н.о.
4. В модельном эксперименте в лабораторных условиях внесение нефти стимулировало микробиологические процессы в ризосфере эспарцета песчаного (*Onobrychis arenaria*): численность аммонифицирующих бактерий увеличивалась в 4 раза и азотфиксирующих – в 3,5 раза. Добавление бактериальной суспензии УВОМ ускоряло процессы деструкции нефти в ризосфере эспарцета, что проявлялось в увеличении коэффициентов минерализации в 37,6 и 10,2 раза в почво-грунте и песке, соответственно. При этом содержание нефти в почво-грунте и песке снизилось в 3,3 и 6,3 миллионов раз по сравнению с исходным количеством внесенной нефти.
5. В природных условиях также было отмечено стимулирование процессов минерализации нефти в ризосфере растения фиторемедианта при добавлении суспензии УВОМ: коэффициент минерализации увеличился в 27,6 раза по сравнению с контрольным участком.
6. Для утилизации нефтяных загрязнений рекомендуется использование эспарцета песчаного с четырьмя штаммами бактерий, которые не подавляли рост ризосферной микрофлоры.

7. Штамм *Arthrobacter pascens* подавлял рост ризосферной микрофлоры эспарцета песчаного в 3-16 раз по сравнению с контролем, поэтому не рекомендован к использованию для фиторемедиации с данным видом растений.

Публикации по материалам работы:

1. Пахарькова, Н.В. Оптимизация выбора растений для биоремедиации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами в условиях Южной Сибири/ Н.В. Пахарькова, С.В. Прудникова, А.С. Гекк, **А. Н. Ларькова**, Н.С. Коростелева // Вестник КрасГАУ. – 2015. – В №8. – С. 28-32
2. **Ларькова, А.Н.** Скрининг плазмидосодержащих штаммов бактерий окисляющих нефтепродукты / А.Н. Ларькова, Н.С. Коростелева // материалы междунар. науч. студ. конф. 16-20 апр. 2016 – Новосибирск, 2016 – с. 130.
3. **Ларькова, А.Н.** Влияние углеводородокисляющих бактерий на ризосферную микрофлору *Onobrychis arenaria* при выращивании на нефтезагрязненной почве / А.Н. Ларькова, Д.А. Шевчук // материалы междунар. конф. совместно с молодежной науч. школой «Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни» 10-14 окт. 2016 – Красноярск, 2016 – с. 121.
4. Шевчук Д.А., **Ларькова А.Н.** Микробиологический анализ почв г. Красноярска, загрязненных нефтепродуктами // Международная конференция совместно с молодежной научной школой «Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни», 10-14 октября 2016, Красноярск
5. **Larkova, A.N.** Phytoremediation of oil contaminated soil / A.N. Larkova // материалы конф. Студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспектив Свободный 2017» - Красноярск, 2017

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Кузнецов А. Е., Градова Н. Б. Научные основы экобиотехнологии. – М.: Мир, 2006. – Гл. 5. – С. 309 – 417.
2. Биоиндикация и реабилитация экосистем при нефтяных загрязнениях: учебное пособие/ А.В. Кураков [и др]; под ред. А.П.Садчикова и С.В.Котелевцева; М.: Изд-во «Графикон», 2006. – С. 3–66.
3. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах.: Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005. – 496 с.
4. Зайцева Т.А. Микроорганизмы – деструкторы нефти / Зайцева Т.А., Рудакова Л.В., Комбарова М.М. //Научные исследования и инновации. – 2010. - № 4. – С. 59-63.
5. Шамраев А.В. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды / Шамраев А.В., Шорина Т.С. // ВестникОГУ, 2009. -№ 6. – с. 642-645.
6. Atlas R. M. Microbial Hydrocarbon Degradation. Bioremediation of oil spills// J. Chem. Technol-Biotechnol. –1991. – 52. – p. 149-156.
7. Смирнова Е. В. Транспорт и распределение жидких углеводородов в выщелоченном черноземе :дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16/ Смирнова Елена Васильевна. – Казань, 2003. – 131 с.
8. Давыдова С. Л. Нефть и нефтепродукты в окружающей среде: учеб. пособие/ С. Л. Давыдова, В. И. Тагасов; М.: Изд-во РУДН, 2004. С. – 163.
9. Назаров А. В. Влияние нефтяного загрязнения почвы на растения / А. В. Назаров // Вестник пермского университета. Серия: Биология. – 2007. – №. 5. С. – 134 – 141.
10. Новоселова Е. И. Роль ферментативной активности почв в осуществлении ею трофической функции в условиях нефтяного загрязнения / Е. И. Новоселова, Н. А. Киреева, М. И. Гарипова //Вестник Башкирского университета. – 2014. – Т. 19. – №. 2. – С. 474.

-
11. Назаров А. В. Изучение причин фитотоксичности нефтезагрязненных почв / А. В. Назаров, С. А. Иларионов //Альтернативная энергетика и экология. – 2005. – №. 1. – С. 60-65
 12. Сангаджиева Л. Х. Влияние нефтяного загрязнения на фитотоксичность светло-каштановых почв Калмыкии / Л. Х. Сангаджиева, Ц. Д. Даваева, А. А. Булуктаев //Вестник Калмыцкого университета. – 2013. – №. 1. – С. 17.
 13. Tang, J. Eco-toxicity of petroleum hydrocarbon contaminated soil / Tang, J., Wang, M., Wang, F., Sun, Q., Zhou, Q. // J. Environ. Sci – 2011 – 23 – p. 845–851.
 14. Sorkhoh N.A. Crude oil and hydro-carbon degrading strains of Rhodococcus: Rhodococcus strains isolated from soil and marine environments in Kuwait / N. A. Sorkhoh, M. A. Ghannoum, A. Ibrahim, R. J. Stretton, S. S. Rdaman // Environmental Pollution – 1990. – V. 65. – p. 1-18.
 15. Ильинский В.В. Углеводородокисляющие бактериоценозы незагрязненных пресных вод и их изменения под влиянием нефтяных углеводородов (на примере юго-восточной части Можайского водохранилища) / В. В. Ильинский, О. В. Поршнева, Т. И. Комарова // Микробиология, 1998. – Т. 2. – С. 267-273.
 16. Гоголева О. А. Углеводородокисляющие микроорганизмы природных экосистем / О.А. Гоголева, Н.В. Немцева. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. – 2012. – № 2. С. 2 – 6.
 17. Wolińska A. Biological Activity of Autochthonic Bacterial Community in Oil-Contaminated Soil / A. Wolińska, A. Kuźniar, A. Szafranek-Nakonieczna, N. Jastrzębska, E. Roguska, Z. Stępniewska //Water, Air, & Soil Pollution. – 2016. – Т. 227. – №. 5. – С. 1-12.
 18. Шаркова С. Ю. Состояние микробного комплекса почв при нефтезагрязнении / С. Ю. Шаркова, Е. А. Полянскова, Е. А. Парфенова //Известия Пензенского государственного педагогического университета им. ВГ Белинского. – 2011. – №. 25. – С. 614 – 617.

-
19. Abbasian F. The Biodiversity Changes in the Microbial Population of Soils Contaminated with Crude Oil / F. Abbasian, R. Lockington, M. Megharaj, R. Naidu //Current microbiology. – 2016. – Т. 72. – №. 6. – С. 663-670.
20. Lim M. W. A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil—Present works and future directions / M. W. Lim, E. Von Lau, P. E. Poh //Marine pollution bulletin. – 2016. – V. 109. – P. 14-45.
21. Григориади А. С. Использование микробного препарата для рекультивации нефтезагрязненной почвы различных типов /А. С. Григориади, Н. А. Киреева, А. Р. Гареева, Т. Н. Щемелинина, О.С. Атепаева //Вестник Башкирского университета. – 2011. – Т. 16. – №. 4. – С. 1214-1218
22. Wołejko E. The ways to increase efficiency of soil bioremediation / E. Wołejko, U. Wydro, T. Łoboda //Ecological Chemistry and Engineering S. – 2016. – Т. 23. – №. 1. – С. 155-174.
23. Хайруллина Г. Г. Очистка почв от нефтепродуктов при помощи растений и ассоциированных с ними микроорганизмами/ Г. Г. Хайруллина, Э. М. Зайнутдинова // Актуальные проблемы науки и техники. Сборник научных трудов IV Международной научно-практической конференции молодых ученых.–Уфа. – 2012. – С. 107.
24. Kirk J. L. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil/ J. L. KirkJohn, N. Klironomos, H. Lee, J. T. Trevors //Environmental Pollution. – 2005. – Т. 133. – №. 3. – С. 455-465
25. Wenzel W. W. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils / W. W. Wenzel //Plant and Soil. – 2009. – Т. 321. – №. 1-2. – С. 385-408.
26. Ковальская Т. В. Характеристика методов рекультивации нефтезагрязнения / Т. В. Ковальская, Е. В. Нуянзина //Рекомендовано к печати редакционно-издательским советом Астраханского государственного университета
Рецензент доктор географических наук, начальник отдела экологического контроля и нормирования. – 2009. – С. 196.

-
27. Salt D.E. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants / , D.E. Salt, M. Blaylock, P.B.A.N. Kumar, V. Dushenkov, B.D. Ensley, I. Chet, I. Raskin // *Nature Biotechnology*. – 1995. – V.13. – P.468–474.
28. Тюленева В.А. Биовосстановление почв, загрязненных нефтепродуктами/ В.А. Тюленева, В.А. Соляник, И.В. Соляник // *Вісник Сумського державного університету. Сер. Технічні науки*. – 2004. - №2 (61). – С. 177-18
29. Arshad M. Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation / M. Arshad, M. Saleem, S. Hussain // *Trends in biotechnology*. – 2007. – Т. 25. – №. 8. – С. 356-362.
30. Bento F. M. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil / F. M. Bento, F. A. de Oliveira Camargo, B. C. Okeke, W. T. Frankenberger Jr // *Microbiological research*. – 2005. – Т. 160. – №. 3. – С. 249-255
31. Тимергазина И. Ф., Переходова Л. С. К проблеме биологического окисления нефти и нефтепродуктов углеводородокисляющими микроорганизмами / И. Ф. Тимергазина, Л. С. Переходова // *Нефтегазовая геология. Теория и практика*. – 2012. – Т. 7. – №. 1. – С.3.
32. Преобразование нефтей микроорганизмами // *Труды Всероссийского нефтяного научно-исследовательского геологоразведочного института*. Под редакцией Б.Г. Хотимского и А.И. Акопиан. – Л.:ВНИГРИ, 1970. - 281с.
33. Hinsinger P. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes / P. Hinsinger, G. R. Gobran, P. J. Gregory, W. W. Wenzel // *New Phytologist*. – 2005. – Т. 168. – №. 2. – С. 293-303.
34. Festa S., Coppotelli B. M., Morelli I. S. Comparative bioaugmentation with a consortium and a single strain in a phenanthrene-contaminated soil: Impact on the bacterial community and biodegradation / S. Festa, B. M. Coppotelli, I. S. Morelli // *Applied Soil Ecology*. – 2016. – Т. 98. – С. 8-19.

-
35. Сидоров А. В. Аборигенные углеводородоокисляющие микроорганизмы в биоремедиации водных ресурсов от нефтяного загрязнения/ А. В. Сидоров, Н. В. Морозов //Современные наукоемкие технологии. – 2007. – №. 1. – С. 63-64.
36. Успехи микробиологии. / Под редакцией А.А. Имшеницкого. – М.: «Наука», 1968б. – Т. 15. –225 с.
37. Ключаева, М.А. Разработка основы биопрепарата для деградации нефти при загрязнении природных сред: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23/ Мария Александровна Ключаева. – Уфа, 2009. – 24 с.
38. Мазлова Е. А. Применение биопрепарата биол в биоремедиации нефтезагрязненных почв и шламов/ Е. А. Мазлова, Л. А. Эррера, Н. В. Еремина// Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2014. - №9. – С. 28-33.
39. Ахмадиев М. В. Применение аборигенных штаммов углеводородоокисляющих микроорганизмов при биоремедиации нефтезагрязненных почв и грунтов/ М. В. Ахмадиев// Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Прикладная экология. Урбанистика. – 2014. – № 2(14). – С. 119-130.
40. Pacwa-Plóciniczak M. Monitoring the changes in a bacterial community in petroleum-polluted soil bioaugmented with hydrocarbon-degrading strains/ M. Pacwa-Plóciniczak , G. A. Płaza, Z. Piotrowska-Seget //Applied Soil Ecology. – 2016. – Т. 105. – С. 76-85.
41. Silva-Castro G. A. Autochthonous microbial responses and hydrocarbons degradation in polluted soil during biostimulating treatments under different soil moisture. Assay in pilot plant / G. A. Silva-Castro, A. Rodriguez-Calvo, J. Laguna, J. González-López, C. Calvo //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2016. – Т. 108. – С. 91-98.
42. Borah D. Plasmid Curing of a Novel Hydrocarbon Degrading Bacillus cereus Strain DRDU1 Revealed its Involvement in Petroleum Oil Degradation / D. Borah,

Y. RNS //Journal of Petroleum & Environmental Engineering. – 2015. – Т. 6. – С. 1 – 4.

43. Ветрова А.А. Влияние катаболических плазмид на физиологические параметры бактерий рода *Pseudomonas* и эффективность биодеструкции нефти / А.А. Ветрова, И. А. Нечаева, А. А. Игнатова, И.Ф. Пунтус, М. У. Аринбасаров, А. Е. Филонов, А. М. Боронин // Микробиология. – 2007. – № 3. – С. 354-360.

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

45. Boronin A.M. Diversity of naphthalene biodegradation systems in soil Bacteria/ A. M. Boronin, I. A. Kosheleva // Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. – 2009. – P. 1155–1165.

46. Панов А. В. Влияние загрязнения почвы на состав микробного сообщества / А. В. Панов, Т. З. Есикова, С. Л. Соколов, И. А. Кошелева, А. М. Боронин //Микробиология. – 2013. – Т. 82. – №. 2. – С. 239-246.

47. Greene E.A. Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons/ E. A. Greene, J. G. Kay, K. Jaber, L. G. Stehmeier, G. Voordouw // Applied and Environmental Microbiology. – 2000. – V. 66. – P. 5282–5289.

48. Hendrickx B. Dynamics of an oligotrophic bacterial aquifer community during contact with a groundwater plume contaminated with benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes: an in situ mesocosm study / B. Hendrickx, W. Dejonghe, W. Boenne, M. Brennerova, M. Cernik, T. Lederer, M. Bucheli-Witschel, L. Bastiaens, W. Verstraete, E.M. Top, L. Diels, D. Springael // Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – V. 71. – P. 3815–3825.

-
49. Gomes N.C.M. Effect of the inoculant strain *Pseudomonas putida* KT2442 (pNF142) and of naphthalene contamination on the soil bacterial community / N.C.M. Gomes, I.A. Kosheleva, A. Wolf-Rainer, K. Smalla // FEMS Microbiology Ecology. – 2005. – V. 54. – P. 21–33.
50. Назаров А. В. Потенциал использования микробно-растительного взаимодействия для биоремедиации / А. В. Назаров, С. А. Иларионов // Биотехнология. – 2005. – №. 5. – С. 54.
51. Шабаев В. П. Применение ростстимулирующих ризосферных бактерий для стимуляции роста растений при загрязнении почвы нефтью, свинцом и кадмием/ В. П. Шабаев // Агрохимия. – 2016. – №8. – С. 82-87.
52. Jidere C. Phytoremediation potentials of cowpea (*Vigna unguiculata*) and maize (*Zea mays*) for hydrocarbon degradation in organic and inorganic manure-amended tropical typic paleustults / Jidere C, Akamigbo F, Ugwuanyi J // Int J Phytorem – 2012 – 14 – p. 362–373.
53. Afzal M, Endophytic bacteria: prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants / Afzal M, Khan QM, Sessitsch A // Chemosphere – 2014 – 117 – p. 232–242.
54. Auta HS. Bioaugmentation of crude oil contaminated soil using bacterial consortium / Auta HS, Ijah U, Mojuetan M. // Adv Sci Focus – 2014 – 2 – p. 26–33.
55. Moore FP. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation / Moore FP, Barac T, Borremans B, Oeyen L, Vangronsveld J, Van der Lelie D, Campbell CD, Moore ER // Syst Appl Microbiol – 2006 - 29 – p. 539–556.
56. Zhu X. Application of endophytic bacteria to reduce persistent organic pollutants contamination in plants / Zhu X, Ni X, Liu J, Gao Y. // Clean:Soil, Air, Water - 2014 – 42 – p. 306–310.

-
57. Ijaz A. Enhanced remediation of sewage effluent by endophyte-assisted floating treatment wetlands/ Ijaz A, Shabir G, Khan QM, Afzal M. // *Ecol Eng* – 2015 – 84 p. 58–66.
58. Ivanova A. A. Oil biodegradation by microbial-plant associations / A. A. Ivanova, A. A. Vetrova, A. E. Filonov, A. M. Boronin // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2015. – Т. 51. – №. 2. – С. 196-201.
59. Fatima K. Plant species affect colonization patterns and metabolic activity of associated endophytes during phytoremediation of crude oil-contaminated soil/ K. Fatima, A. Imran, I. Amin, Q. M. Khan, M. Afzal // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2016. – Т. 23. – №. 7. – С. 6188-6196.
60. Гафарова Е. В. Влияние цеолитсодержащей породы и растений на биологическую активность выщелоченного чернозема, загрязненного нефтяными углеводородами: автореф. дис. на соиск. учен. степ. к. б. н.: 03.00.07/ Евгения Владимировна Гефарова – Казань, 2006. – 24 с.
61. Нетрусов А. И. Практикум по микробиологии: учеб. пособие / А. И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л. М. Захарчук и др. – Москва: Издательский центр «Академия», 2005. – С. 572.
62. Никитина Е. В., Решетник О. А. Методы общей и специальной микробиологии: учеб. пособие / Е. В. Никитина, О.А. Решетник / Казан. гос. технол. ун-т. Казань – 2007. – С.64.
63. Кочетков В. В. Плазмиды биодegradации нафталина у бактерий рода *Pseudomonas*: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.16 / Кочетков Владимир Васильевич. – Пушино, 1985. – 145 с.
64. Hill K.E. Gene transfer in soil systems using microcosms/ K.E.Hill, E.M.Top // *FEMS Microbiol. Ecol.* -1998. -V. 25. -P. 319-329.
65. Прозоров А. А. Дополнительные хромосомы бактерий: свойства и происхождение / А.А. Прозоров // *МИКРОБИОЛОГИЯ*. – 2008. – Т. 77. – №. 4. – С. 437-447.

-
66. Hayes F. The function and organization of plasmids/ F. Hayes //E. coli Plasmid Vectors: Methods and Applications. Methods in Molecular Biology – V. 235 - 2003. – С. 1-17.
67. Рубин А. Б. Биофизические методы в экологическом мониторинге/ А.Б. Рубин //Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6. – №. 4. – С. 10.