

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ Т.Г. Волова

«___» июня 2019 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Оценка биоремедиационного потенциала микрофлоры почвы и речной воды,
загрязненных нефтепродуктами

06.04.01 Биология

06.04.01.09 «Фундаментальная и прикладная биология»

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

Выпускник _____ Д.А. Шевчук

Рецензент _____ к.б.н. Л.В. Мухортова

Красноярск 2019

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему «ОЦЕНКА БИОРЕМЕДИАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИКРОФЛОРЫ ПОЧВЫ И РЕЧНОЙ ВОДЫ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЕПРОДУКТАМИ» содержит 58 страниц текстового документа, 20 рисунков, 1 таблицу и 62 источника литературы.

Ключевые слова: нефтеокисляющие микроорганизмы, нефтепродукты, микрофлора почвы, нефтезагрязненная почва, биоремедиация.

Исследование влияния нефти и нефтепродуктов на микрофлору позволяют оценить пределы устойчивости микроорганизмов разных экосистем к загрязнителям и выявить штаммы, способные к эффективной трансформации нефтепродуктов и окислению до безопасных соединений. Исходя из этого, микробиологический контроль почвы и воды на территориях, подвергшихся загрязнению нефтепродуктами, становится актуальной задачей.

Цель данной работы – оценка способности природных штаммов микроорганизмов расти в условиях загрязнения нефтепродуктами и использовать углеводороды нефти в качестве субстрата.

Задачи:

1. Провести сравнительный анализ численности микроорганизмов в контрольных образцах почвы и загрязненных нефтепродуктами.
2. Определить численность бактерий и микромицетов в образцах воды реки Енисей с контрольных и нефтезагрязненных участков.
3. Выделить из микробных сообществ почвы и речной воды доминирующие бактерии, устойчивые к нефтезагрязнению, и провести их идентификацию.
4. Оценить динамику численности нефтеокисляющих бактерий при инкубировании в почве в условиях загрязнения нефтью.
5. Оценить способность штаммов нефтеокисляющих бактерий к деструкции сырой нефти в почве.

Было выявлено, что нефтепродукты оказывают негативное влияние как на почвенную микрофлору, так и на водную. Были выделены штаммы микроорганизмов, которые можно рекомендовать для биоремедиации почвы, загрязненной нефтепродуктами, так как они оказались наиболее устойчивы к воздействию углеводородов нефти и снижали концентрацию нефти в почве.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
1 Обзор литературы	7
1.1 Проблема загрязнения окружающей среды нефтью	7
1.2 Характеристика углеводородов как компонентов нефти и их воздействие на окружающую среду.....	9
1.3 Влияние нефтяного загрязнения на микробиологические процессы в почве	13
1.4 Углеводородоокисляющие микроорганизмы	15
1.5 Микробная деградация нефтяных углеводородных загрязнителей	17
1.5.1 Микробная деградация нефтяных углеводородов	17
1.5.2 Факторы, влияющие на деградацию углеводородов нефти	18
1.5.3 Механизм деградации углеводородов нефти.....	20
1.5.4 Ферменты, участвующие в деградации углеводородов.....	21
1.5.5 Поглощение углеводородов биосурфактантами	22
1.5.6 Биodeградация нефтяных углеводородов иммобилизованными клетками.....	23
1.7 Биоремедиация нефтезагрязненных почв	24
2 Объекты и методы исследования	27
2.1 Объекты исследования	27
2.2 Методы выделения микроорганизмов из образцов почвы и воды	27
2.3 Методы идентификации микроорганизмов	28
2.4 Метод исследования способности микроорганизмов к деградации нефти	32

2.5	Метод определения содержания остаточной нефти в почве	33
3	Результаты исследования	34
3.1	Влияние нефтепродуктов на микрофлору в образцах почвы с территории автозаправочных станций... Ошибка! Закладка не определена.	
3.2	Влияние нефтепродуктов на микрофлору воды в образцах воды реки Енисей	Ошибка! Закладка не определена.
3.3	Видовое разнообразие углеводородокисляющих бактерий в загрязненной почве и воде	Ошибка! Закладка не определена.
3.4	Оценка способности штаммов нефтеокисляющих бактерий к деструкции сырой нефти в почве	Ошибка! Закладка не определена.
3.5	Филогенетический анализ бактерий-деструкторов нефти	Ошибка! Закладка не определена.
	Заключение	35
	Список использованных источников	36

ВВЕДЕНИЕ

Современный мир и окружающая среда в значительной степени подвергаются антропогенному воздействию, что в свою очередь негативно сказывается на экологической ситуации и приводит к ее ухудшению. Среди всех негативных факторов наибольшую опасность представляет загрязнение нефтью и продуктами ее переработки. Эта проблема особенно актуальна для России, занимающей одно из лидирующих мест по нефтедобыче.

На территории России сосредоточены десятки тысяч скважин, более тысячи нефтебаз и десятки нефтеперерабатывающих заводов [1]. Влияние предприятий нефтегазовой отрасли связано с выносом токсичных веществ при добыче и транспортировке сырья и продуктов переработки, которые могут влиять на почвенные экосистемы как локально, так и при переносе некоторых загрязнителей на значительные расстояния. При этом, длительное антропогенное влияние загрязняющих веществ оказывает неблагоприятное воздействие на формирование почвенных биоценозов, в том числе и микробных [2].

Нефтепродукты возглавляют список опасных химических загрязнителей окружающей среды и, по мнению ряда авторов, их накопление приводит к угнетению или полному ингибированию роста и развития большинства растений, почвы становится фитотоксичными.

Одним из решений важной экологической проблемы, утилизации нефтяных загрязнений, является применение биологических объектов, способных использовать углеводороды в качестве субстрата. Известно, что бактерии играют решающую роль в самоочищении почвы и водоемов от загрязнения углеводородами нефти, однако высокие концентрации нефтепродуктов могут ингибировать рост микрофлоры и подавлять процессы самоочищения. Исследование влияния нефти и нефтепродуктов на микрофлору позволяют оценить пределы устойчивости микроорганизмов разных экосистем к загрязнителям и выявить штаммы, способные к

эффективной трансформации нефтепродуктов и окислению до безопасных соединений. Исходя из этого, микробиологический контроль почвы и воды на территориях, подвергшихся загрязнению нефтепродуктами, становится актуальной задачей

Целью данной работы является оценка способности природных штаммов микроорганизмов расти в условиях загрязнения нефтепродуктами и использовать углеводороды нефти в качестве субстрата.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ численности микроорганизмов в контрольных образцах почвы и загрязненных нефтепродуктами.

2. Определить численность бактерий и микромицетов в образцах воды реки Енисей с контрольных и нефтезагрязненных участков.

3. Выделить из микробных сообществ почвы и речной воды доминирующие бактерии, устойчивые к нефтезагрязнению, и провести их идентификацию.

4. Оценить динамику численности нефтеокисляющих бактерий при инкубировании в почве в условиях загрязнения нефтью.

5. Оценить способность штаммов нефтеокисляющих бактерий к деструкции сырой нефти в почве.

1 Обзор литературы

1.1 Проблема загрязнения окружающей среды нефтью

Загрязнение любого рода негативно сказывается на окружающей среде, однако классифицируют как особо опасный загрязнитель. Нефть не растворяется в воде и, следовательно, обычно плавает на поверхности воды, а также абсорбируется в почве.

Нефтяные загрязнения наиболее распространены в крупных водоемах, таких как моря и океаны. Разлив нефти происходит из-за выброса жидкого нефтяного углеводорода в водную среду. Морская вода особенно подвержена этой форме загрязнения. Загрязнение нефтью – это, прежде всего, антропогенное загрязнение, которое является результатом безответственной деятельности человека.

Загрязнение нефтью происходит в основном из-за сырой нефти. Суда и танкеры, перевозящие сырую нефть через океаны, могут вызывать смертельные разливы нефти в морской воде по разным причинам, причем утечка является наиболее распространенным фактом. Количество разливов нефти имеет значение, когда речь идет о значении загрязнения нефтью воды. Во время морских аварий количество разливов нефти огромно. Разливы в таких больших количествах происходят регулярно.

Кроме того, разливы нефти на мелководье иногда могут быть более опасными, чем глубоководные. Нефть соединяется с грязью и другими грязными веществами и опускается на дно водоемов. В результате этого нефть имеет тенденцию оставаться на дне целую вечность, оказывая вредное воздействие на морскую жизнь, живущую на дне моря.

Когда происходит очень большое загрязнение нефтью, очистить воду потом крайне затруднительно. Меры, принимаемые для устранения последствий загрязнения, могут оказаться бесполезными, если действия не будут предприняты в нужное время. Поэтому целесообразно принимать профилактические меры, а не лечебные.

В соответствии Постановлением Правительства РФ №240 от 15 апреля 2002 г. «О порядке организации мероприятий по предупреждению и ликвидации разливов нефти и нефтепродуктов на территории Российской Федерации», следует объявлять чрезвычайную ситуацию при авариях, сопровождающихся разливом нефти. В зависимости от масштабов таких аварий они приобретают характер от локального (до 100 т), до регионального (от 1000 до 5000 т) и федерального (свыше 5000 т)[3].

Только по официальным данным, в России ежегодно происходит более 10 тысяч разливов нефти из-за разорванных нефтепроводов. По оценкам некоторых экспертов, около 4,5 млн. тонн нефти и нефтепродуктов попадают в окружающую среду из-за разрыва трубопровода каждый год. Однако год от года количество разливов нефти не уменьшается, а нефтяные компании практически не несут финансовой ответственности за экологическую катастрофу, происходящую во всех нефтедобывающих регионах.

Между тем нефтяные компании имеют доступ к технологиям и финансовым ресурсам, которые могут позволить им поддерживать трубопроводы в безопасных условиях. Например, по словам министра природных ресурсов и экологии Российской Федерации, модернизация трубопроводной сети нефтяных месторождений обойдется нефтяным компаниям примерно в 1,3 трлн рублей. Для сравнения, чистая прибыль нефтяных компаний в России за 5 лет с 2007 по 2011 год составила 4,9 трлн рублей.

Однако нефтяные компании в России предпочитают экономить за счет безопасности и здоровья окружающей среды и населения.

Эксперты Гринпис России и комитета «Спасите Печору» тщательно изучили пробелы и недостатки в российском законодательстве, из-за которых проблема разливов нефти остается нерешенной в течение многих лет, и предложили конкретные меры для их устранения. Эти меры по совершенствованию законодательства раскрыты в совместном отчете «Загрязнение нефтью: проблемы и возможные решения».

1.2 Характеристика углеводов как компонентов нефти и их воздействие на окружающую среду

Углеводороды – это органические соединения, молекулы которых состоят только из атомов углерода и водорода. Подразделяются углеводороды на алифатические или ациклические углеводороды, в молекулах которых углеродные атомы образуют линейные или разветвленные "открытые" цепи (например, изопрен, этан), и циклические углеводороды, молекулы которых представляют собой циклы (кольца) из трех и более атомов углерода. Последние подразделяют на алициклические соединения (например, циклогексан) и ароматические соединения (например, бензол) Углеводороды имеют важное научное и практическое значение.

Во-первых, представления о строении и свойствах этих веществ служат основой для изучения органических соединений других классов, так как молекулы любых органических веществ содержат углеводородные фрагменты.

Во-вторых, знание свойств углеводов позволяет понять исключительную ценность этих соединений как исходного сырья для синтеза самых разнообразных органических веществ, широко используемых человеком [4].

Углеводороды содержатся в земной коре в составе нефти, каменного и бурого углей, природного и попутного газов, сланцев и торфа. К сожалению, запасы этих полезных ископаемых на Земле не безграничны. Однако до настоящего времени они расходуются в качестве топлива (двигатели внутреннего сгорания, тепловые электростанции, котельные) и лишь незначительная часть используется как сырье в химической промышленности. Так, до 85% всей добываемой нефти идет на получение горюче-смазочных материалов и лишь около 15% применяется как химическое сырье. Поэтому важнейшей задачей является поиск и разработка

альтернативных источников энергии, которые позволят более рационально использовать углеводородное сырье [5].

Нефть - это природная горючая маслянистая жидкость, которая распространена в осадочной оболочке Земли и является важнейшим полезным ископаемым. В ее состав входит смесь углеводородов самого разнообразного строения. Их молекулы представляют собой короткие и длинные, нормальные и разветвленные, замкнутые в кольца и много кольчатые цепи атомов углерода.

Путем перегонки из нее получают различные продукты нефти: бензин, реактивное топливо, осветительный керосин, дизельное топливо и мазут [6]. Основу нефти составляют три группы углеводородов: метановые, нафтеновые и ароматические. Метановые углеводороды (алкановые или алканы) химически наиболее устойчивы, они относятся к предельным углеводородам и имеют формулу C_nH_{2n+2} . Если количество атомов углерода в молекуле колеблется от 1 до 4 (CH_4 - C_4H_{10}), они газообразны, от 5 до 16 (C_5H_{12} - $C_{16}H_{34}$) то это жидкие углеводороды, а если оно выше 16 ($C_{17}H_{36}$ и т.д.) - твердые (например, парафин).

Нафтеновые (циклановые, или алициклические) углеводороды имеют кольчатое строение, поэтому их иногда называют карбоциклическими соединениями. Все связи углерода с водородом здесь также насыщены, поэтому нафтеновые нефти обладают устойчивыми свойствами. К нафтенам относят углеводороды C_nH_{2n} (мононафтенy), C_nH_{2n-2} и C_nH_{2n-4} (полинафтенy). По сравнению с парафинами, нафтенy имеют более высокую плотность, меньшую упругость паров и лучшую растворяющую способность. Ароматические углеводороды, или арены (C_nH_n), наиболее бедны водородом. Молекула имеет вид кольца с ненасыщенными связями углерода. Они так и называются - ненасыщенными, или непредельными углеводородами. Отсюда их неустойчивость в химическом отношении [7].

Ароматические углеводороды нефти составляют от 5 до 55%. Это наиболее токсичные компоненты нефти, и при концентрации всего 1% в воде

они убивают водные низшие растения. Нефть, содержащая 38% ароматических углеводородов, значительно угнетает рост и высших растений, а с увеличением ароматичности нефти возрастает их гербицидная активность. Содержание всех групп полициклических ароматических углеводородов при постепенной трансформации нефти в почве постепенно снижается. Ароматические углеводороды трудно поддаются разрушению, обычно медленно окисляясь микроорганизмами.

Кроме углеводородов в составе нефти имеются кислородные, сернистые и немного азотистые соединения. Нефть и газ в земных недрах могут встречаться как вместе, так и раздельно. Нефть включает в себя большую и сложную группу жидких, газообразных и твердых углеводородов, то есть соединения углерода и водорода. А также соединения азота, кислорода и серы. По свойствам нефть немного легче воды и практически в ней не растворяется [8].

Так как нефть – это жидкое природное ископаемое состоящее из большого числа высокомолекулярных углеводородов (УВ), то у нее нет определенной температуры кипения (Шамраев А.В. 2009). Цвет нефти также не определен. Он варьирует от светло-коричневой, почти бесцветной, до темно-бурой, почти черной, а по свойствам плотности - от легкой 0,65-0,70 г/см³, до тяжелой 0,98-1,05 г/см³. Различают легкую (0,65-0,87 г/см³), среднюю (0,871-0,910 г/см³) и тяжелую (0,910-1,05 г/см³) нефть. Теплота сгорания 43,7-46,2 МДж/кг (10400-11000 ккал/кг).

Нефть растворяется в органических растворителях. При обычных условиях в воде практически не растворяется, но может образовывать с ней стойкие эмульсии. Нефть и нефтепродукты относятся к наиболее распространенным поллютантам природной среды, вызывая существенные изменения в химическом составе, свойствах и структуре почвы [9].

Нефть является распространенным техногенным загрязнителем, при разливах которой на длительное время нарушается нормальное функционирование почвенной экосистемы, ухудшается почвенное

плодородие и резко меняется интенсивность и направленность окислительно-восстановительных процессов. Поступление нефти в почву неоднозначно влияет на активность ферментов, которая может как усиливаться [10], так и ослабевать в зависимости от дозы и вида загрязнителя и типа почвы, подвергшейся загрязнению.

По результатам исследования С.И. Колесникова с соавторами (2007), загрязнение чернозема нефтью (от 1 до 25% массы почвы) в большинстве случаев снижало активность почвенных ферментов. При относительно незначительном нефтезагрязнении (1%) уровень активности каталазы в почве с течением времени восстанавливался, а при существенном загрязнении (10%) увеличивался. По степени чувствительности к загрязнению почвы нефтью и нефтепродуктами исследованные ферменты указанные авторы предполагают расположить следующим образом: ферриредуктаза > каталаза > уреазы > инвертаза.

По их мнению, при нефтяном загрязнении изменяются окислительно-восстановительные условия в почве в сторону восстановительных, так как нефть и нефтепродукты заполняют поры, обволакивают частицы почвы, тем самым снижают воздухопроницаемость, создают анаэробные условия и уменьшают окислительно-восстановительный потенциал почвы. Более чувствительны к изменению окислительно-восстановительных условий оксидоредуктазы (ферриредуктаза, каталаза), чем гидролазы (уреазы, инвертазы).

В многолетних полевых и лабораторных исследованиях Н.А. Киреевой с соавторами (2004) изучалось влияние различных концентраций нефти на общую численность почвенных бактерий и микроскопических грибов. Было установлено, что большая часть типов нефти негативно влияет на численность почвенных микроорганизмов при содержании нефтяных углеводов более 10% массы почвы. Более низкие дозы загрязнителя способствовали росту численности бактерий и грибов вследствие бурного развития углеводородокисляющей микробиоты. Динамика численности

микроорганизмов в этом случае не была связана напрямую с токсичностью почвы, а момент достижения исходной численности совпадал с завершением процесса разложения легкодоступных для микроорганизмов нефтяных фракций. В почве всегда содержится некоторое количество неустойчивых, чувствительных к нефтяному загрязнению видов микромицетов.

По мнению данных ученых, под воздействием нефтепродуктов в комплексе почвенных микроскопических грибов может увеличиваться доля условно-патогенных и аллергенных для человека видов, таких, как *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani*, *Paecylomyces variotii* и др. Нефтяное загрязнение может также способствовать накоплению в почве микроскопических грибов, вызывающих заболевания растений и выделяющих фитотоксины.

1.3 Влияние нефтяного загрязнения на микробиологические процессы в почве

Процесс естественного фракционирования и разложения нефти начинается с момента ее поступления на поверхность почвы. Выделяют три наиболее общих этапа трансформации нефти в почвах [11]:

1. физико-химическое и частично микробиологическое разложение алифатических углеводородов;
2. микробиологическое разрушение главным образом низкомолекулярных структур разных классов, новообразование смолистых веществ;
3. трансформация высокомолекулярных соединений; смол, асфальтенов, полициклических углеводородов.

Процесс под названием трансформация нефти по своей природе в разных почвенно-климатических зонах может занимать по времени от нескольких месяцев до нескольких десятков лет [12].

Загрязнение нефтью оказывает отрицательное воздействие на физические, химические и биологические свойства почв.

Стоит отметить, что численность микроорганизмов изменяется из-за влияние нефти и ее компонентов, помимо всего прочего негативное влияние оказывается и на саму почву: ухудшаются агрохимические, агрофизические свойства почвы, снижается активность окислительно-восстановительных и гидролитических ферментов, обеспеченность почвы подвижными формами азота и фосфора.

На разложение нефти в почве решающим образом влияет функциональная активность комплекса почвенных микроорганизмов, обеспечивающих полную минерализацию нефти и нефтепродуктов до углекислого газа и воды. На первой стадии изменение почвенной биоты характеризуется массовой гибелью мезо- и микрофауны; на второй стадии – «бумом» микробиологической активности специализированных микроорганизмов и последующей постепенной эволюцией биоценоза, коррелирующей с постоянно изменяющейся геохимической ситуацией в почве [13].

В работе Н. А. Киреевой показана токсичность ароматических углеводов для микроорганизмов почвы и их негативное воздействие на ферментативную активность. Наиболее чувствительными к загрязнению ароматическими углеводородами являются нитрифицирующие и целлюлозоразрушающие микроорганизмы, которые могут служить индикаторами загрязнения почв [14].

Загрязнение нефтью очень сильно изменяет комплекс почвенных актиномицетов, снижая не только их численность, но и обедняя видовой состав. Помимо всего прочего, в почве загрязненной нефтью возрастает число фитотоксичных и фитопатогенных видов микроскопических грибов. Развитие фитотоксичных форм грибов может усугубить ситуацию отрицательного воздействия на почву нефтяного загрязнения [14].

Доказано, что загрязнение нефтью и нефтепродуктами приводит к ярко выраженному (на два порядка) снижению численности гетеротрофной части микробного комплекса, отмеченного на начальных этапах воздействия

нефти. Через три месяца происходит восстановление численности гетеротрофов [15].

Первоначально, в интервале концентраций нефти соответствующих зоне гомеостаза (до 1 мл/кг), она не оказывает существенного влияния на почвенную микробиоту, а наоборот выступает как биологический стимулятор. Более высокие дозы (зона стресса 1-30 мл/кг) приводят к необратимым изменениям микробиологических свойств почвы, а в дальнейшем, к нарушению ее водно-воздушного режима. Затем, в зоне резистентности, она становится основным трофическим субстратом для углеводородокисляющих микроорганизмов, одновременно угнетая жизнедеятельность других гетеротрофных микроорганизмов, растений и животных. Наконец, при еще больших дозах, в зоне репрессии, нефть выступает как ингибитор биологической активности почвы [16].

Изменения микробиологических параметров почвы первыми рассматриваются как значимые экологические нарушения. Они зафиксированы при концентрациях нефти более 1-5 мл/кг в зависимости от типа почвы.

1.4 Углеводородокисляющие микроорганизмы

Углеводородокисляющие микроорганизмы широко распространены в природных экосистемах, так как способность к окислению углеводов связана с наличием ферментов группы оксидаз [17, 18, 19]. Однако основной вклад в процесс микробиологического разрушения углеводов вносят микроорганизмы, способные использовать нефть и нефтепродукты в качестве единственного источника углерода и энергии. Такие микроорганизмы встречаются, главным образом, среди аэробных форм, они получили название «углеводородокисляющие микроорганизмы» [20,21, 22].

Углеводородокисляющие микроорганизмы являются частью гетеротрофного сообщества и присутствуют как в загрязненных, так и в незагрязненных экосистемах [23, 24, 25]. Углеводородокисляющие

микроорганизмы имеют отличия от других гетеротрофных микроорганизмов, такие как: способностью к поглощению гидрофобного субстрата и наличие комплекса ферментов, окисляющих углеводороды.

При загрязнении биоценоза нефтью и нефтепродуктами появляется дополнительный источник углерода в экосистеме, что стимулирует развитие данной группы бактерий [26], поэтому в хронически загрязненных экосистемах, численность углеводородокисляющих бактерий всегда выше по сравнению с не загрязненными экосистемами, но количественная связь между численностью углеводородокисляющих бактерий и количеством углеводородов в среде отсутствует [27, 28].

Таксономический разнообразие углеводородокисляющих микроорганизмов представлен, в основном, бактериями и грибами.

Описано 22 рода бактерий, 19 родов дрожжей и 24 рода микроскопических мицелиальных грибов [28, 29, 30].

Типичными обитателями почв являются виды родов *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Brevibacterium*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacteriaceae*, *Mycobacterium*, *Beierinckia*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Xanthomonas* и др. [31, 32, 33, 34, 35].

Известно, что состав доминирующих представителей углеводородокисляющих бактерий в биоценозах зависит от природы нефтепродукта. Так, Т.В. Коронелли (1996) указывает, что для загрязненных экосистем характерно доминирование видов рода *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и *Arthrobacter*.

В хронически загрязненных экосистемах безусловным доминантом являются *Rhodococcus*, а остальные виды занимают второстепенное положение [36, 37].

1.5 Микробная деградация нефтяных углеводородных загрязнителей

Одна из главных экологических проблем сегодня – загрязнение углеводородами нефти в результате деятельности, связанной с нефтехимической промышленностью. Случайные выбросы нефтепродуктов вызывают особую озабоченность в окружающей среде. Известно, что углеводородные компоненты относятся к семейству канцерогенов и нейротоксичных органических загрязнителей.

В настоящее время общепринятые методы захоронения небезопасных отходов (мусоросжигание или захоронение на специальных полигонах) могут стать чрезмерно дорогими, если количество загрязняющих веществ велико. Механические и химические методы, обычно используемые для удаления углеводородов с загрязненных участков, имеют ограниченную эффективность и могут быть дорогостоящими.

Биоремедиация является перспективной технологией для обработки этих загрязненных участков, так как она экономически эффективна и приведет к полной минерализации. Биоремедиация в основном обусловлена биodeградацией нефтепродуктов биологическими агентами, такими как микроорганизмы, которые способствуют полной минерализации органических загрязнителей в диоксид углерода, воду, неорганические соединения и клеточный белок или превращению сложных органических загрязнителей в другие более простые органические соединения. Многие местные микроорганизмы в воде и почве способны разлагать углеводородные загрязнения.

1.5.1 Микробная деградация нефтяных углеводородов

Биоразложение нефтяных углеводородов является сложным процессом, который зависит от природы и количества присутствующих углеводородов. Нефтяные углеводороды можно разделить на четыре класса: сатураты, ароматические соединения, асфальтены (фенолы, жирные кислоты, кетоны,

сложные эфиры и порфирины) и смолы (пиридины, хинолины, карбазолы, сульфоксиды и амиды).

Одним из важных факторов, ограничивающих биоразложение нефтяных загрязнителей в окружающей среде, является их ограниченная доступность для микроорганизмов. Нефтяные углеводородные соединения связываются с почвенными компонентами, и их трудно удалить или разложить.

Углеводороды отличаются своей восприимчивостью к микробной атаке. Восприимчивость углеводородов к микробной деградации обычно может быть ранжирована следующим образом: линейные алканы, разветвленные алканы, небольшие ароматические циклические алканы. Некоторые соединения, такие как высокомолекулярные полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), могут вообще не разлагаться.

Микробная деградация является основным и окончательным природным механизмом, с помощью которого можно очистить углеводородные загрязнители нефти от окружающей среды.

Бактерии являются наиболее активными агентами при разложении нефти, и они действуют как первичные разрушители разлитой нефти в окружающей среде. Известно, что некоторые бактерии питаются исключительно углеводородами.

Известно более 25 родов углеводород-разрушающих бактерий и 25 родов углеводород-разрушающих грибов, которые были выделены из морской среды.

1.5.2 Факторы, влияющие на деградацию углеводородов нефти

Существует ряд ограничивающих факторов, влияющих на биоразложение нефтяных углеводородов. Состав и присущая биоразлагаемость нефтяного углеводородного загрязнителя является первым и наиболее важным фактором, когда необходимо оценить пригодность восстановительного подхода.

Среди физических факторов температура играет важную роль в биоразложении углеводородов, напрямую влияя на химический состав загрязняющих веществ, а также на физиологию и разнообразие микробной флоры. Известно, что при низких температурах вязкость масла увеличивается, а летучесть токсичных низкомолекулярных углеводородов снижается, задерживая начало биоразложения.

Температура также влияет на растворимость углеводородов. Хотя биоразложение углеводородов может происходить в широком диапазоне температур, скорость биоразложения обычно уменьшается с понижением температуры. Известно, что самые высокие показатели деградации, которые обычно имеют место в диапазоне 30–40 °С в почвенной среде, 20–30 °С в некоторых пресноводных средах и 15–20 °С в морской среде. Также температура окружающей среды влияет как на свойства разлитой нефти, так и на активность микроорганизмов. Значительная биодеградация углеводородов отмечена в психрофильной среде в умеренных регионах.

Питательные вещества являются очень важными ингредиентами для успешного биоразложения углеводородных загрязнителей, особенно азота, фосфора и в некоторых случаях железа. Некоторые из этих питательных веществ могут стать ограничивающим фактором, влияющим на процессы биодеградации. При крупных разливах нефти в морской и пресноводной среде, запас углерода значительно увеличивается, и доступность азота и фосфора, как правило, становится ограничивающим фактором для разложения нефти. В морской среде было обнаружено, что ограничивающий фактор более выражен из-за низкого уровня азота и фосфора в морской воде. Пресноводные водно-болотные угодья, как правило, считаются дефицитными питательными веществами из-за высокой потребности растений в питательных веществах. Поэтому необходимо добавление питательных веществ необходимо для усиления биодеградации нефтяного загрязнителя.

С другой стороны, чрезмерные концентрации питательных веществ также могут ингибировать активность биodeградации. Некоторые авторы сообщают о негативном влиянии высоких уровней NPK на биodeградацию углеводов, особенно на ароматические соединения. Эффективность удобрений для биоремедиации сырой нефти в субарктических литоральных отложениях была изучена [38]. Также сообщалось об использовании птичьего помета в качестве органического удобрения в загрязненной почве, и было обнаружено, что биodeградация усиливается только в присутствии птичьего помета. Известно, что фотоокисление увеличивает биоразлагаемость нефтяного углеводорода за счет увеличения его биодоступности и, следовательно, усиления микробной активности.

1.5.3 Механизм деградации углеводов нефти

Наиболее быстрая и полная деградация большинства органических загрязнителей происходит в аэробных условиях. Первоначальная внутриклеточная атака органических загрязнителей представляет собой окислительный процесс, а активация, а также включение кислорода - это ключевая ферментативная реакция, катализируемая оксигеназой и пероксидазой. Периферические пути деградации постепенно превращают органические загрязнители в промежуточные продукты центрального промежуточного метаболизма, например, цикл трикарбоновых кислот. Биосинтез клеточной биомассы происходит из центральных предшественников метаболитов, например, ацетил-КоА, сукцината, пирувата. Сахара, необходимые для различных биосинтезов и роста, синтезируются путем глюконеогенеза.

Разложение нефтяных углеводов может быть опосредовано специфической ферментной системой. Другие вовлеченные механизмы включают прикрепление микробных клеток к субстратам и производство биосурфактантов. Механизм поглощения, связанный с прикреплением клетки

к капле масла, до сих пор неизвестен, но производство биосурфактантов хорошо изучено.

1.5.4 Ферменты, участвующие в деградации углеводов

Алкангидроксилазы цитохрома P450 представляют собой суперсемейство вездесущих гемо-тиолатмонооксигеназ, которые играют важную роль в микробной деградации нефти, хлорированных углеводов, топливных присадок и многих других соединений.

В зависимости от длины цепи ферментные системы должны вводить кислород в субстрат, чтобы инициировать биodeградацию. Высшие эукариоты обычно содержат несколько различных семейств P450, которые состоят из большого числа отдельных форм P450, которые могут вносить вклад в виде множества изоформ в метаболическое превращение данного субстрата. У микроорганизмов такая множественность P450 встречается только у немногих видов.

Было обнаружено, что ферментные системы цитохрома P450 участвуют в биodeградации нефтяных углеводов. Способность нескольких видов дрожжей использовать n-алканы и другие алифатические углеводороды в качестве единственного источника углерода и энергии обеспечивается наличием множества микросомальных форм цитохрома P450. Эти ферменты цитохрома P450 были выделены из таких видов дрожжей, как *Candida maltosa*, *Candida tropicalis* и *Candida apicola*.

Разнообразие алканоксигеназных систем у прокариота и эукариот, которые активно участвуют в деградации алканов в аэробных условиях, таких как ферменты цитохрома P450, цельные мембранные ди-железо-алкановые гидроксилазы (например, alkB), растворимые монооксигеназы ди-железа-метана и связанные с мембраной медьсодержащие метанооксигеназы обсуждались [39].

1.5.5 Поглощение углеводов биосурфактантами

Биосурфактанты представляют собой гетерогенную группу поверхностно-активных химических соединений, продуцируемых разнообразными микроорганизмами. Поверхностно-активные вещества усиливают солубилизацию и удаление загрязнений. Биодegradация также усиливается сурфактантами из-за повышенной биодоступности загрязняющих веществ. Камеотра и Сингх (2009) сообщили о биоремедиации нефтешламов с использованием биосурфактантов. В этом исследовании был использован микробный консорциум, состоящий из двух изолятов *Pseudomonas aeruginosa* и одного изолята *Rhodococcus erythropolis* из почвы, загрязненной маслянистым илом. Консорциум смог разложить 90% углеводов за 6 недель в жидкой культуре. Способность консорциума разлагать углеводороды шлама была проверена в двух отдельных полевых испытаниях. Кроме того, было также оценено влияние двух добавок (питательной смеси и неочищенного препарата биосурфактанта на эффективность процесса. Используемый биосурфактант был произведен членом консорциума и был идентифицирован как смесь 11 конгенов рамнолипидов.

Отдельное использование любой добавки вместе с консорциумом привело к снижению содержания углеводов на 91–95% за 4 недели. При этом препарат неочищенного биосурфактанта является более эффективным усилителем деградации.

Однако при добавлении обеих добавок вместе с консорциумом было получено более 98% истощения углеводов. Данные подтверждают использование неочищенного биосурфактанта для восстановления углеводов.

Псевдомонады являются наиболее известными бактериями, способными использовать углеводороды в качестве источников углерода и энергии и производить биосурфактанты. Среди псевдомонад *P. aeruginosa* широко изучается для производства биосурфактантов гликолипидного типа.

Тем не менее, биосурфактанты гликолипидного типа также сообщаются от некоторых других видов, таких как *P. putida* и *P. chlororaphis*.

Биосурфактанты увеличивают площадь поверхности масла, и такое количество масла фактически доступно бактериям для его использования

Биосурфактанты могут действовать как эмульгаторы, уменьшая поверхностное натяжение и образуя мицеллы. Микрокапельки, инкапсулированные в поверхности гидрофобных микробных клеток, забираются внутрь и разлагаются.

1.5.6 Биодegradация нефтяных углеводов иммобилизованными клетками

Иммобилизованные клетки были использованы и изучены для биоремедиации многочисленных токсичных химических веществ. При исследовании *Pseudomonas sp.* разлагать бензин в водной системе, было установлено, что иммобилизация привела к комбинации увеличенного контакта между клеточными и углеводородными каплями и повышенным уровнем продукции рамнолипидов. Рамнолипиды вызывали большую дисперсию нерастворимых в воде *n*-алканов в водной фазе благодаря их амфипатическим свойствам, а молекулы, состоящие из гидрофильных и гидрофобных фрагментов, снижали межфазное натяжение водонефтяных систем. Это привело к более высокому взаимодействию клеток с каплями солюбилизированного углеводорода, намного меньшего размера, чем клетки, и быстрому поглощению углеводорода клетками.

По литературным источникам было установлено, что иммобилизация бактериальных клеток увеличивала скорость биодegradации сырой нефти по сравнению со свободными живыми клетками в широком диапазоне. Иммобилизация может выполняться как в переменном режиме, так и в непрерывном режиме.

1.7 Биоремедиация нефтезагрязненных почв

В последние годы в связи со значительной интенсификацией добычи нефти и производства нефтепродуктов значительные масштабы приобрел процесс отторжения земель из сельскохозяйственного использования.

Нефть и нефтепродукты в настоящее время являются первенствующими загрязнителями всех компонентов биосферы – почвенного покрова, вод поверхностных, растительности и атмосферного воздуха. Последствия, которые происходят в результате загрязнения почв нефтью и всеми нефтепродуктами зависят в основном от параметров загрязнения, свойств почвы и характеристик внешней среды [40].

Почва подвергаясь загрязнению резко теряет свою биологическую продуктивность и физико-химические свойства, в результате чего почва не способна полноценно выполнять свои экологические функции. Методы биоремедиации нефтезагрязненных земель в настоящее время приобретают все большее значение.

Для биоремедиации используются различные бактериальные препараты, которые способны потреблять загрязнения и разрушать их. Одним из наиболее перспективных направлений совершенствования процессов биоремедиации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, является использование потенциала не только микробных, но и других природных сообществ разных трофических уровней и, в первую очередь, травянистых растений, которые могли бы не только удалять загрязнители, но и способствовать восстановлению потенциального плодородия почв.

Углеводороды нефти и их производные – природные химические вещества, широко используемые человеком. В связи с достаточно интенсивной добычей и переработкой нефти и нефтепродуктов они являются основными загрязнителями окружающей среды [41]. Страны, в которых очень хорошо развита промышленность, загрязнение почвы сырой нефтью и нефтепродуктами является очень серьезной проблемой. Во всем мире

ежегодно теряется и попадает в окружающую среду около 45-50 млн. т нефти и нефтепродуктов, в России – 3 млн. т (1,2 % от объема добычи нефти) [42].

При ремедиации почв, загрязненных нефтью и продуктами ее переработки, используют химические, биологические методы и физические, а также их сочетания.

Физические методы удаления загрязнения (промывка почвы водой под давлением, удаление и захоронение нефти и сильно загрязненной почвы, сбор, термообработка, мульчирование слоем почвы, землевание и др.) не способствуют восстановлению плодородия почв и могут нанести дополнительный ущерб окружающей среде [43].

Химическая обработка путем экстракции растворителями или окислением изменяет агрохимические характеристики почвы и грунтовых вод. Сжигание загрязненных почв дополнительно вызывает загрязнение атмосферы.

В настоящее время, с повышением внимания к охране окружающей среды, биоремедиация все активнее используется для очистки загрязненных почв. Биологическая очистка способствует тому, чтобы преобразовать загрязнитель из токсичной формы в нетоксичную, используя микробиологические процессы, а также может приводить к полной минерализации углеводов до воды и диоксида углерода.

Многие технологии биоремедиации нефтезагрязненных почв предлагают проводить интродукцию микроорганизмов, специализирующихся на разложении имеющихся углеводов, однако в некоторых случаях интродуцированные микроорганизмы не выдерживают конкуренции с почвенной микробиотой. К тому же, концентрации субстрата в окружающей среде могут быть слишком низкими, чтобы поддерживать рост введенных штаммов или интродуцированные микроорганизмы могут игнорировать целевой загрязнитель, если присутствуют другие субстраты. В некоторых случаях инокуляция микроорганизмов для очистки почвы от

углеводородов нефти только дополнительно увеличивает стоимость биоремедиации и не дает никакой выгоды.

Поэтому технологии биоремедиации активно разрабатываются, основанные на стимулировании аборигенной микробиоты загрязненной почвы, способной разлагать загрязняющие вещества [44].

Данные технологии ремедиации предполагают необходимость создания оптимальных условий для микробного разложения углеводородов: создание аэробных условий, обеспечение доступными питательными веществами, определенной влажности почвы, рН, температуры и др. Для улучшения естественной способности почвенных микроорганизмов расщеплять углеводороды нефти, были предложены и проверены многие методы: рыхление, орошение; известкование или гипсование; внесение удобрений, поверхностно-активных веществ, ферментов или ко-субстратов; добавление сорбентов; внесение структурообразователей; фитомелиоративные мероприятия и др. [43].

Все эти процедуры активируют естественные биологические, химические и физические процессы трансформации и удаления органических загрязнителей, протекающие в почве.

2 Объекты и методы исследования

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования в настоящей работе являлись микроорганизмы, выделенные из окружающей среды.

Территории, загрязненные нефтепродуктами:

- почва из района Ванкорского месторождения (Туруханский район),
- почва с территории АЗС г. Красноярска (ул. Калинина, пр. Свободный 44Б, пр. Свободный 77, ул.Высотная 2р)
- вода реки Енисей в районе Нефтебазы.

Контрольные (чистые) территории:

- почва в районе Академгородка,
- вода реки Енисей в районе Свято-Успенского монастыря.

2.2 Методы выделения микроорганизмов из образцов почвы и воды

В работе использовали общепринятые методы микробиологии [45]. Численность микроорганизмов определяли методом посева на питательные среды. Органотрофные бактерии выделяли на мясопептонном агаре (МПА), микромицеты – на среде Сабуро. Определяли количество микроорганизмов в образцах чистой почвы и воды, а также загрязненной нефтепродуктами. Посев производили в трёхкратной повторности из разведений до 10^7 . Чашки с посевами выдерживали в термостате при температуре 30 °С для бактерий и 25 °С для грибов.

Чистые культуры доминирующих бактерий получали методом пересева изолированных колоний на скошенный питательный агар.

Для получения накопительных культур углеводородокисляющих микроорганизмов осуществляли посев образцов почвы или речной воды на жидкую минеральную среду следующего состава (г/л): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 1,0; $NaNO_3$ – 3,0; KCl – 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,01; вода

водопродная [45]. В колбы со 100 мл минеральной среды добавляли 1 мл стерильной нефти и 1 г почвы или 1 мл речной воды. Инкубация протекала при 30°C в шейкере-инкубаторе JEIOTECHSL-600 (Корея) в течение 7 суток. Затем выделяли чистые культуры бактерий, высевая их на агаризованную питательную среду (Nutrientagar, Platecounteagar) и минеральный агар со стерильной нефтью.

Для выделения углеводородокисляющих микроорганизмов, способных использовать нефть в качестве единственного источника углерода, использовали метод посева микроорганизмов на агаризованную минеральную среду с добавлением стерильной нефти (г/л): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 1,0; $NaNO_3$ – 3,0; KCl – 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,01; агар – 18; вода водопродная. На среду высевали суспензию микроорганизмов, затем, на поверхность среды, наносили и распределяли шпателем 1 мл стерильной нефти. Так как микроорганизмы могут использовать CO_2 в качестве источника углерода, параллельно проводили посев на минеральную среду без добавления стерильной нефти для исключения способности к автотрофному росту. Культивировали при 30°C. Фиксировали рост микроорганизмов на 5-7 сутки, изолированные колонии отсеивали на скошенный агар (МПА).

2.3 Методы идентификации микроорганизмов

При идентификации изолятов бактериальных проводили сравнительный анализ их культуральных, морфологических, биохимических свойств. Определяли грампринадлежность, морфологию вегетативных клеток, подвижность, спорообразование, каталазную активность, оксидазную, протеиназную и амилазную активность, образование кислоты из лактозы, глюкозы, сахарозы, маннита и мальтозы.

Грампринадлежность определяли экспресс-методом Греггерсена. Клетки культур помещали стерильной бактериологической петлей в каплю 3%-го раствора КОН на предметное стекло, перемешивали круговыми движениями и через 4-7 секунд петлю приподнимали. Суспензия

грамположительных бактерий распределялась равномерно в растворе щелочи. Суспензия грамотрицательных бактерий тянулась за петлей и становилась вязкой. Реакцию считали отрицательной, если образование слизистых тяжей не наблюдалось в течение 60 секунд.

При изучении физико-химических свойств культур, определяли их способность продуцировать каталазу. С помощью стерильной бактериологической петли клетки культур перенесли на предметное стекло, затем добавляли одну каплю 3% раствора пероксида водорода на культуру клеток на предметном стекле. Положительная реакция протекала при быстром образовании пузырьков газа. При отрицательной реакции в течение 20 секунд выделение газа отсутствовало.

Для выявления амилалитической активности использовали среду следующего состава (г/л): агар – 15.0; пептон – 10.0; растворимый крахмал - 2.0; KH_2PO_4 – 5.0; pH среды 6,8 – 7.0. Среду стерилизовали при температуре 121 °С 30 минут и разливали в стерильные чашки Петри. Исследуемые микроорганизмы высевали штрихом по диаметру чашки. Продолжительность культивирования составила 7 суток, при температуре 30°C. Гидролиз крахмала выявляли после обработки агаровой поверхности раствором Люголя. Для этого на поверхность чашки со средой наливали 3-5 мл раствора Люголя, в следствие чего зоны гидролиза крахмала приобретали красно-бурую окраску, а среда окрашивалась в синий цвет. (рис. 1).



Рисунок 1 – Тест на амилазную активность

При изучении протеолитической активности необходимо было провести посев культуры на мясопептонную желатину (МПЖ). К 100 мл мясопептонного бульона (МПБ) добавили 15 г желатины, оставили на 15 минут, чтобы она набухла, затем нагрели до полного растворения желатины на водяной бане и разлили в пробирки по 10 мл. Стерилизовали при температуре 121 °С 15 минут. Посев проводили уколом. Время культивирования составило 10 суток при комнатной температуре. Разжижение желатины отмечали визуально.

Оксидазную активность выделенных культур бактерий определяли с помощью тест-полосок окситест (MIKRO-LA-TEST) (рис. 2).



Рисунок 2 – Оксидазная активность: а – отрицательная;
б – положительная.

Способность культур ферментировать углеводы изучали на универсальных средах Гисса. В состав этих сред входят: гидролизат кильки, панкреатический индикатор и различные углеводы (сахароза, глюкоза, мальтоза, лактоза, манит). Приготовление среды осуществлялось следующим образом – 15 грамм препарата размешивали в 1 литре дистиллированной воды, кипятили до полного растворения. Разлили в стерильные пробирки. Засев проводили уколом, культивировали в течение 3 дней. Визуально отмечали образование кислоты и газа (рис. 3).

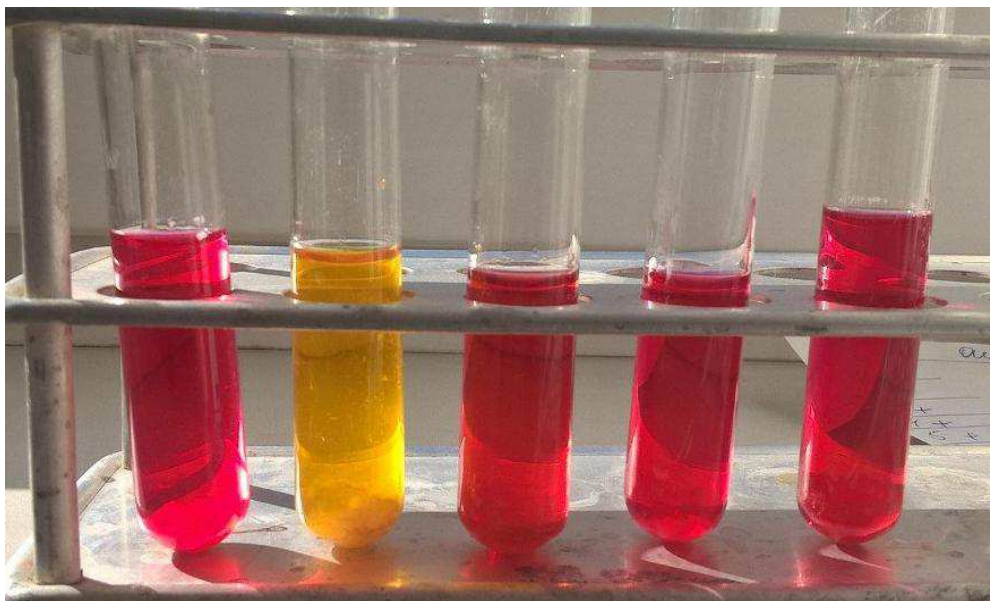


Рисунок 3 – Рост бактерий на среде Гисса с образованием кислоты

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

Исследуемые штаммы бактерий в чистой суточной культуре отбирали микробиологической петлей с поверхности скошенного агара и наносили на стальной планшет для MALDI-TOF масс-спектрометрии (MTP 384 massive, «BrukerDaltonics», Германия). Затем на каждый образец наслаивали по 2 мкл матрицы - α -СНСА («BrukerDaltonics», Германия) в растворе матрицы, содержащем 2,5% трифторуксусной кислоты и 50% ацетонитрила. Планшет с содержимым подвергался высушиванию до образования кристаллов (5 минут). В качестве контрольного образца, а также в качестве внешнего калибратора использовался экстракт штамма *E. coli* DH5a.

Было использовано 50 импульсов лазера, для получения каждого масс-спектра, с мощностью излучения, установленной на уровне минимального порогового значения. 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.

Идентификацию двух штаммов бактерий с высокой нефтеокисляющей способностью проводили методом секвенирования последовательности гена 16S-рРНК на базе Группы фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск). Полученные сиквенсы сравнивали с последовательностями фрагментов генов 16S-рРНК, представленных в базе данных GenBank, с помощью программы поиска и сравнения нуклеотидных последовательностей BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.4 Метод исследования способности микроорганизмов к деградации нефти

Динамику численности микроорганизмов в почве, загрязненной нефтью, и их способность к деградации нефти исследовали в лабораторных условиях в почвенных микроэкосистемах. В пластиковые контейнеры насыпали 200 г почвы, вносили 2 мл сырой нефти и 10 мл суспензии чистой культуры бактерий. Контейнеры инкубировали в термостате при 28 °С. Численность микроорганизмов в почве определяли на 3, 10 и 13 сутки, количественным учетом, высевая на МПА в разведении до 10^6 , учет численности микроорганизмов проводили на 5-7 сутки.

2.5 Метод определения содержания остаточной нефти в почве

Остаточное содержание нефти в почве определяли гравиметрическим методом[46]. Навеску почвы 10г взвешивали на аналитических весах, с точностью до третьего знака, переносили в колбу и приливали 10мл гексана, взбалтывали и приливали еще 10 мл, затем оставляли настаиваться в течении 10минут. Затем полученную смесь через фильтр переносили в тщательно промытые и заранее взвешенные бюксы, после чего оставляли на сутки в вытяжном шкафу до полного испарения гексана.

3 Результаты исследования

Изъято 17 страниц

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проделанной работы были следующие выводы:

1. Численность всех исследованных групп бактерий в образцах почв АЗС, загрязненных нефтепродуктами, была снижена в 4,5-150 раз в сравнении с контрольным незагрязненным образцом. Наибольшее негативное влияние углеводороды оказали на рост микромицетов.

2. Численность бактерий и микромицетов в образцах воды реки Енисей, загрязненных нефтепродуктами, была снижена в 2 раза в сравнении с контрольным незагрязненным образцом.

3. Из образцов нефтезагрязненной почвы и воды было выделено и идентифицировано 12 штаммов микроорганизмов, потенциально способных к деструкции углеводородов нефти: *Nocardia salmonicida*, *Bacillus pumilus*, *Streptomyces griseus*, *Pseudomonas koreensis*, *Rhodococcus fascianus*, *Pseudomonas proteolytica*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Agromyces sp.*, *Bacillus velezensis*, *Pseudomonas putida*.

4. Внесение чистых культур выделенных штаммов микроорганизмов в почву, загрязненную нефтью, в большинстве случаев приводило к увеличению численности бактерий в почве, однако рост численности бактерий не всегда сопровождался снижением остаточной концентрации нефти в почве, что может быть обусловлено конкурентным взаимоотношением с аборигенной микрофлорой.

5. Штаммы *Bacillus velezensis*, *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas koreensis* оказались наиболее активными деструкторами нефти и могут быть рекомендованы как агенты биоремедиации нефтезагрязненных территорий.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Чикина Н.С., Мухамедшин А.В., Анкудинова А.В. и [др.]. Снижение экологической нагрузки от разливов нефти и нефтепродуктов с помощью сорбента на основе пенополиуретана и отходов зерновых культур // Вестник Казанского технологического университета, 6, 184-192 (2009).
2. Пархоменко А. Н. Влияние загрязнения нефтепродуктами и серой на микрофлору почв аридной зоны (на примере Астраханской области). – 2011. АВТОРЕФЕРАТ диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук
3. Лашков В. А., Суфиянов Р. Ш. Источники образования и проблемы утилизации нефтесодержащих грунтов // Вестник Казанского технологического университета. – 2014. – Т. 17. – №. 2.
4. Вредные химические вещества. Углеводороды. Галогенпроизводные углеводородов: Справ. изд. / А.Л. Бандман – Л.: Химия, 1990. – 732 с.
5. Грищенко А.И., Аكوпова Г.С., Максимов В.М. Экология. Нефть и газ. – М: Наука, 1997. - 598 с.
6. Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем: сб. ст. – М.: Наука, 1998. – С. 222-230.
7. Гаврилов В.П. Черное золото планеты.-2-е изд., перераб. и доп.- М.:Недра,1990. – 160 с.: С. 25-28
8. Buckley E. N. Characterization of microbial isolates from an estuarine ecosystem: relationship of hydrocarbon utilization to ambient hydrocarbon concentrations / E.N. Buckley, R.B. Jonas, F.K. Pfaender // Applied and environmental microbiology. – 1976. – Т. 32. – №. 2. – С. 232-237.
9. Иларионов С.А. Роль микромицетов в фитотоксичности нефтезагрязненных почв / С.А. Иларионов, А.В. Назаров, И.Г. Калачникова // Экология. – 2004. – №5. – С. 341-346.

10. Алиев С.А. Рекомендации по рекультивации нефтезагрязненных земель / Д.В. Гвозденко, М.П. Бабаев, Д.А. Гаджиев - Баку: Элм,1981.-26 с.

11. Исмаилов Н.И. Современное состояние методов рекультивации нефтезагрязненных земель / Н.И. Исмаилов, Ю.И. Пиковский // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем.- М.: Наука, 1988.- С. 222-236.

12. Бочарникова Е.Д. Влияние нефтяного загрязнения на свойства серо-бурых почв Апшерона и серых лесных почв Башкирии / Е.Д. Бочарникова // Автореф. Дис. ... канд. биол. наук.- М.: 1990.-16 с.

13. Логинов О.Н. Биотехнологические методы очистки окружающей среды от техногенных загрязнений / О.Н. Логинов, Н.Н. Силищев, Т.Ф. Бойко, Н.Ф. Галимзянова.-Уфа: Гос. изд. научно-тех. литературы «Реактив», 2000. – 100 с.

14. Киреева Н.А. Состояние комплекса актиномицетов нефтезагрязненных почв / Н.А. Киреева // Вест. Баш. Ун-та.-1996.- № 1.-С. 42-45.

Киреева Н.А. Влияние загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами на численность и видовой состав микромицетов / Н.А. Киреева, Н.Ф. Галимзянова // Почвоведение, 1995.- №2,- С.211-216.

15. Сидоров Д.Г. Полевой эксперимент по очистке почв от нефтяного загрязнения с использованием углеводородокисляющих микроорганизмов / Д.Г. Сидоров, И.А. Борзенков, Р.Р. Ибатулин, Е.И. Милехина, И.Т. Храмов, С.С. Беляев, М.В. Иванов // Прикладная биохимия и микробиология.- 1997.- Т.33, №5.- С.497-502

16. Левин С.В. Эколого-микробиологическое нормирование содержания нефти в почве / С.В. Левин, Э.М. Халимов, В.С. Гузев // Токсикологический вестник.-1995.- №1.- С. 11-15.

17. Готтшалк Г. Метаболизм бактерий: учебное пособие / Г. Готтшалк. - М., Мир, 1982.

18. Мурзакова Г.Б. Биотехнология очистки нефтезагрязненных территорий: Обзорная информация / Г.Б. Мурзакова, М.Б. Битеева, Г.Н. Морщакова // М.: НИИСЭНТИ. – 1992.
19. Ленгелер Й. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах.: Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. - М., Мир, 2005.
20. Израэль Ю.А. Антропогенная экология океана : монография / Ю.А. Израэль, А.В. Цыбань. - Л.: Гидрометеиздат, 1989.
21. Биоиндикация и реабилитация экосистем при нефтяных загрязнениях / А. В. Кураков [и др.]. - М.: Графикон. – 2006. – С. 408.
22. Патин С.А. Экологические проблемы освоения нефтегазовых ресурсов морского шельфа / С.А. Патин - М.: Изд-во ВНИРО, 1997.
23. Барышникова Л.М. Глюкозный эффект в регуляции транспорта глюкозы клетками *Rhodococcus minimus*. / Л.М. Барышникова, Н.А. Черемис, Е.Л. Головлев // Журн. микробиол. 1994, 3: 405- 410
24. Зайцева Т.А. Микроорганизмы – деструкторы нефти. Научные исследования и инновации. / Т.А. Зайцева, Л.В. Рудакова, М.М. Комбарова, и др. // 2010, 4: 59-63.
25. Милько Е.С. Гетерогенность популяций бактерий и процесс диссоциации (корине- и нокардиоподобные бактерии) : монография / Е.С. Милько, Н.С. Егоров - М.: Изд.-во МГУ, 1991.
26. Шамраев А.В. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды / А. В. Шамраев, Т. С. Шорина // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – №. 6. – С. 642-645.
27. Ильинский В.В. Гетеротрофный бактериопланктон: экология и роль в процессах естественного очищения среды от нефтяных загрязнений : автореф. дис. ... докт. биол. наук. / Ильинский Владимир Викторович. - М. МГУ, 2000.

28. Atlas R.M. Microbial hydrocarbon degradation bioremediation of oil spills / Atlas R.M. //Journal of Chemical Technology and Biotechnology. – 1991. – Т. 52. – №. 2. – С. 149-156.
29. Мурзакова Г.Б. Биотехнология очистки нефтезагрязненных территорий: Обзорная информация / Г.Б. Мурзакова, М.Б. Битеева, Г.Н. Морщакова // - М.: НИИСЭНТИ. – 1992.
30. Хомякова Д.В. Угледородоокисляющая микробиота нефтезагрязненных почв района Крайнего Севера : Биоразнообразие восстанавливаемых территорий (под ред. Капелькиной Л.П.) / Д.В. Хомякова, И.В. Ботвинко, А.И. Нетрусов. — Наука СПб, 2002. — С. 15–30.
31. Квасников Е.И. Некоторые закономерности распространения микроорганизмов, усваивающих углеводороды, в почвахнефтяных месторождений / Е.И. Квасников, И.П. Кривицкий // Микробиология. - 1968. — Т.37. Вып.2. — С. 321 -326.
32. Киреева Н.А. Фенолоксидазная активность нефтезагрязненных почв / Н.А. Киреева, Г.Ф. Ямалетдинова // Вестник Башкирского университета. - 2000, 1: 48-51.
33. Сидоров, Д. Г. Полевой эксперимент по очистке почв от нефтяного загрязнения с использованием угледородоокисляющих микроорганизмов/ Д.Г. Сидоров, И.А. Борзенко, Р.Р. Ибатуллин //Прикладная биохимия и микробиология. – 1997. – Т. 33. – №. 5. – С. 497-502
34. Сопрунова О. Б. Циано-бактериальные сообщества в биодеградации нефтяных углеводородов в почвах / О.Б.Сопрунова // Электронный журнал «Исследовано в России. – 2005. – Т. 94. – С. 991-998.
35. Ткебучава Л.Ф. Угледородоокисляющие и сульфатредуцирующие бактерии грунтов Можайского водохранилища / Л.Ф. Ткебучава // Водные ресурсы. – 2004. – Т. 31. – №. 5. – С. 606-606.
36. Бердичевская М. В. Свойства и видовой состав родококков пластовых вод Пермского Прикамья, окисляющих углеводороды / М. В. Бердичевская [и др.] // Журн. микробиол. – 1984. – Т. 4. – С. 681-685.

37. Belyaev S. S. Halotolerant and extremely halophilic oil-oxidizing bacteria in oil fields / S. S. Belyaev [et al.] // *Developments in Petroleum Science*. – 1993. – Т. 39. – С. 79-88.
38. Pelletier E., Delille D., Delille B. Crude oil bioremediation in sub-Antarctic intertidal sediments: chemistry and toxicity of oiled residues // *Marine Environmental Research*. – 2004. – Т. 57. – №. 4. – С. 311-327.
39. Van Beilen J. B., Funhoff E. G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2007. – Т. 74. – №. 1. – С. 13-21.
40. Пиковский Ю.И. Природные и техногенные потоки углеводородов в окружающей среде / Ю.И. Пиковский // М.: изд-во МГУ. – 1993. – Т. 207. – С. 3.
41. Другов Ю.С. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов / Ю.С. Другов, А.А. Родин // М.: Бином. Лаборатория знаний. – 2007. – С. 270.
42. Бурлака В. В., Назарчук В. Г. Шахты и экология // *Экологические проблемы угольной промышленности Украины*. – 2006. – №. 7. – С. 15-20.
43. Подавалов Ю.А. Экология нефтегазового производства: монография / Ю.А. Подавалов. – Litres, 2014.
44. Гоголева О.А. Углеводородоокисляющие микроорганизмы природных экосистем / О.А. Гоголева, Н.В. Немцева // *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. – 2012. – №. 2.
45. Нетрусов, А. И., Егорова, М. А., & Захарчук, Л. М. (2005). *Практикум по микробиологии* / Под ред. А.И. Нетрусова. М.: Академия.
46. Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах почв гравиметрическим методом. ПНД Ф 16.1.41-2004. – 12 с.
47. Коронелли Т. В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводородов в окружающей среде / Т. В.

Коронелли // Прикладная биохимия и микробиология. – 1996. – Т. 32. – №. 6. – С. 579-585.

48. Хоулт, Д., Криг, Н., & Снит, П. (1997). Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. М.: Мир.

49. Ильин Л.А. Вредные химические вещества. Радиоактивные : Справочное издание вещества / Л.А. Ильин, В.А Филов;. – Л., – Химия 1990.

50. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды / А.В. Шамраев, Т.С. Шорина // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – №. 6.

51. Воробьева Л. А. Химический анализ почв / Л.А. Воробьева [и др.] // Вопросы и ответы. – 2012.

52. K. A. Kvenvolden and C. K. Cooper, “Natural seepage of crude oil into the marine environment,” *Geo-Marine Letters*, vol. 23, no. 3-4, pp. 140–146, 2003. View at Publisher • View at Google Scholar • View at Scopus

53. C. Holliger, S. Gaspard, G. Glod, C. Heijman, W. Schumacher, R. P. Schwarzenbach, and F. Vazquez, “Contaminated environments in the subsurface and bioremediation: organic contaminants,” *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 20, no. 3-4, pp. 517–523, 1997. View at Publisher • View at Google Scholar • View at Scopus

54. P. J. J. Alvarez and T. M. Vogel, “Substrate interactions of benzene, toluene, and para-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, no. 10, pp. 2981–2985, 1991. View at Google Scholar • View at Scopus

55. J. I. Medina-Bellver, P. Marín, A. Delgado, A. Rodríguez-Sánchez, E. Reyes, J. L. Ramos, and S. Marqués, “Evidence for in situ crude oil biodegradation after the Prestige oil spill,” *Environmental Microbiology*, vol. 7, no. 6, pp. 773–779, 2005. View at Publisher • View at Google Scholar • View at PubMed • View at Scopus

56. T. M. April, J. M. Foght, and R. S. Currah, “Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada,”

Canadian Journal of Microbiology, vol. 46, no. 1, pp. 38–49, 2000. View at Google Scholar • View at Scopus

57. W. Ulrici, “Contaminant soil areas, different countries and contaminant monitoring of contaminants,” in Environmental Process II. Soil Decontamination Biotechnology, H. J. Rehm and G. Reed, Eds., vol. 11, pp. 5–42, 2000. View at Google Scholar

58. J. G. Leahy and R. R. Colwell, “Microbial degradation of hydrocarbons in the environment,” Microbiological Reviews, vol. 54, no. 3, pp. 305–315, 1990. View at Google Scholar • View at Scopus

59. C. E. Zobell, “Action of microorganisms on hydrocarbons,” Bacteriological Reviews, vol. 10, pp. 1–49, 1946. View at Google Scholar

60. R. M. Atlas, “Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective,” Microbiological Reviews, vol. 45, no. 1, pp. 180–209, 1981. View at Google Scholar • View at Scopus

61. R. M. Atlas, Ed., Petroleum Microbiology, Macmillan, New York, NY, USA, 1984.

62. Cameotra S. S., Singh P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas species* //Microbial cell factories. – 2009. – T. 8. – №. 1. – C. 16.

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

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова

«5» июня 2019 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Оценка биоремедиационного потенциала микрофлоры почвы и речной воды,
загрязненных нефтепродуктами

06.04.01 Биология

06.04.01.09 «Фундаментальная и прикладная биология»

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

Выпускник  Д.А. Шевчук

Рецензент  к.б.н. Л.В. Мухортова

Красноярск 2019