

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

Утверждаю
Заведующий кафедрой

_____ Т.Г. Волова
« ____ » _____ 2024 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**Применение аборигенных штаммов почвенных микроорганизмов
для фитобиоремедиации нефтезагрязненных почв**

06.03.01 – Биология

06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Научный руководитель	_____	проф., д-р биол. наук	С.В. Прудникова
Выпускник	_____		М.А. Редькина
Рецензент	_____	с.н.с., канд. биол. наук	Г.И. Антонов

Красноярск 2024

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Применение аборигенных штаммов почвенных микроорганизмов для фитобиоремедиации нефтезагрязненных почв» содержит 52 страницы текстового документа, 28 иллюстраций, 4 таблицы, 53 использованных источников.

Ключевые слова: *биоремедиация, фитотоксичность, нефтеструкторы, очистка почвы, углеводородокисляющие бактерии.*

Актуальность разработки и совершенствования способов безопасных методов реабилитации почв обусловлена высоким вкладом нефти и нефтепродуктов в загрязнение биосферы. Микробная реабилитация является наиболее перспективным методом очистки различных биотопов, загрязнённых нефтью или нефтепродуктами, поэтому целью работы была оценка возможности использования аборигенных штаммов почвенных бактерий для фитобиоремедиации почвы, загрязненной нефтью. Для этого были выполнены следующие задачи: из нефтезагрязненной почвы получены нефтеокисляющие штаммы бактерий, исследовано их влияние на ризосферную микрофлору растения-ремедианта, проведена оценка способности исследуемых штаммов снижать фитотоксичность нефтезагрязненной почвы, выявлены наиболее эффективные нефтеструкторы.

В результате работы из садовой почвы с высоким уровнем загрязнения сырой нефтью (16 вес.%) были выделены и охарактеризованы 15 штаммов бактерий, из них 4 штамма имеют потенциал для очистки почв загрязненных нефтью. Выделенные штаммы не снижали общую численность бактерий в почвенных образцах и не проявляли угнетающее действие на прорастание семян пшеницы яровой. Было показано, что при обработке загрязненной почвы бактериальными суспензиями фитотоксичность почвы снижается в течение 14 суток.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 Обзор литературы	7
1.1 Характеристика и свойства нефти.....	7
1.2 Загрязнение экосистем нефтепродуктами	10
1.3 Микробная переработка нефти и нефтепродуктов.....	11
1.4 Современные подходы к борьбе с нефтяными загрязнениями	14
1.5 Характеристика углеводородокисляющих бактерий	15
1.6 Использование растений для фиторемедиации нефтяных загрязнений почвы	16
2 Объекты и методы исследования	19
2.1 Объекты исследования	19
2.2 Методы исследования.....	19
2.2.1 Выделение микроорганизмов из нефтезагрязненной почвы.....	19
2.2.2 Исследование свойств и идентификация выделенных микроорганизмов.....	19
2.2.3 Оценка использования бактериями сырой нефти в качестве единственного источника углерода.....	24
2.2.4 Оценка способности выделенных штаммов бактерий к деградации нефти в почве	26
2.2.5 Оценка фитотоксичности нефтезагрязненной почвы после обработки бактериями	27
2.2.6 Оценка действия выделенных штаммов бактерий на ризосферную микрофлору пшеницы	28
3 Результаты исследования	29
3.1 Видовое разнообразие и характеристика аборигенных почвенных бактерий, устойчивых к нефтяному загрязнению	29

Заключение	46
Список использованных источников	47

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время среди загрязнителей окружающей среды нефть и нефтепродукты являются приоритетными [1]. Данные поллютанты способны значительно изменить процессы в почвенных биоценозах. Происходит изменение физико-химических свойств почвы, угнетается её самоочищение [2]. Биоремедиация с использованием микроорганизмов и растений считается самым перспективным и безопасным методом очищения экосистем от нефтяных загрязнений. Положительная роль растений и микроорганизмов-деструкторов связана со способностью обоих преобразовывать токсичные соединения, активировать деятельность друг друга, и, как следствие, интенсифицировать процессы очищения загрязненных экосистем [3,4].

Создание биопрепаратов на основе микроорганизмов, способных утилизировать нефть, является важным аспектом в решении проблемы рекультивации почв. Актуальность поиска эффективных бактерий-нефтедеструкторов и оценка их способности очищения почвы в комплексе с растениями-фиторемедиантами обусловлена активным ростом нефтяных загрязнений.

В связи с этим целью данной работы – оценка возможности использования аборигенных штаммов почвенных бактерий для фитобиоремедиации почвы, загрязненной нефтью.

Для реализации заданной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделить из почвы аборигенные штаммы бактерий, устойчивые к нефтяному загрязнению, и провести их идентификацию.
2. Оценить способность выделенных бактерий к использованию нефти в качестве единственного источника углерода и снижению концентрации нефтепродуктов в почве.
3. Исследовать влияние выделенных бактерий на ризосферную микрофлору тестового растения-фиторемедианта (пшеница яровая).

4. Выявить наиболее эффективные штаммы бактерий для снижения фитотоксичности почвы в комбинации с растением-фиторемедиантом.

Работа выполнялась на базовой кафедре биотехнологии ИФБиТ.

1 Обзор литературы

1.1 Характеристика и свойства нефти

Состав нефти разнообразен и может оцениваться с разных сторон [5].

Первая характеристика нефти – это её элементный состав. Нефть - это сложная смесь более 50 различных химических элементов, что делает ее качественную оценку по содержанию элементов весьма сложной задачей. Однако стоит отметить, что среди всех этих элементов наиболее распространены углерод и водород [6]. Эти два элемента играют ключевую роль в химическом составе нефти. Помимо них, в нефти также присутствуют и другие элементы, такие как кислород, сера, азот, и многие другие. В следующей таблице приведен примерный элементный состав нефти, который поможет лучше понять ее химическую структуру и разнообразие элементов, составляющих этот важный природный ресурс.

Таблица 1 – Элементный состав нефти [7]

Элементы	Процентный диапазон, вес. %
Углерод	83–87
Водород	11,5–14
Сера	0,01–6
Азот	0,001–1,8
Кислород	0,005–0,35
Ванадий	10^{-5} – 10^{-2}
Никель	10^{-4} – 10^{-3}
Хлор	от следов до 2×10^{-2}

Важной характеристикой так же является фракционный состав. Фракции нефти (газообразная, легкая, тяжелая) испаряются в разных диапазонах температур. В Таблице 1 приведены фракции нефти и интервалы

температуры кипения для каждой из них. При оценке состава нефти обнаружено, что нефть из разных источников будет иметь разное соотношение фракций [8]. Особенно ценным является наличие в нефти большого количества бензиновой фракции, которая содержит циклические углеводороды. Такая нефть подходит для производства качественного топлива [9].

Таблица 2 – Характеристика фракций нефти

Тип	Фракция	Интервал температур кипения (°C)	Количество атомов углерода
Газ	Нефтяной газ		C ₁ –C ₄
Легкая нефть	Бензин	30-180	C ₅ –C ₁₀
	Керосин	180-280	C ₁₀ –C ₁₆
	Дизельное топливо	280-350	C ₁₇ –C ₂₀
Тяжелая нефть	Смазочное масло	350–500	C ₁₈ –C ₃₀
	Вазелин		C ₂₀ –C ₃₀
	Парафин		C ₃₀ –C ₄₀
	Мазут	>500	>C ₄₀

Нефть – это горючая сложная углеводородная смесь. Соотношение разных углеводородов сильно варьирует, поскольку в составе нефти обнаружены сотни углеводородов различного строения и многочисленные гетероатомные соединения [10]. Однако, углеводороды подразделяются на три основных класса: алкановые, циклоалкановые и ароматические [11]. Ниже представлено описание и иллюстрация некоторых углеводородов, входящих в состав нефти.

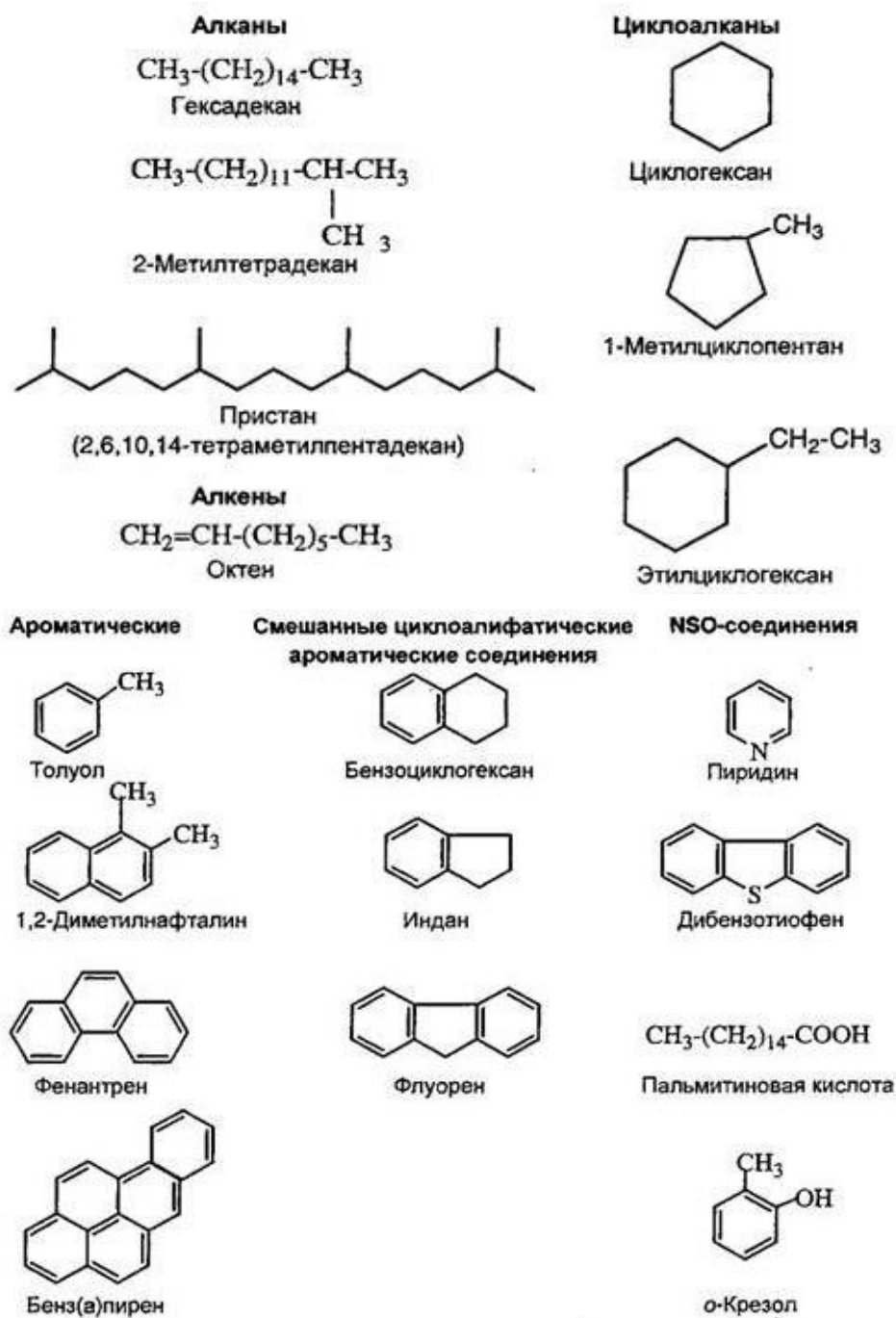


Рисунок 1 – Углеводороды нефти

Алкановая группа имеет формулу $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$. Алканы могут быть разветвленными и нормальными. Часто нефть подвергают дополнительной обработке, чтобы получить больше разветвлённых алканов в составе. Алкановая группа в составе нефти может занимать 25-30%, в зависимости от месторождения [12].

Циклоалкановые углеводороды (нафтены) образуют пяти и шестичленные циклы. В основном в сырой нефти преобладают гомологи циклопентана и циклогексана. Нафтены встречаются во всех фракциях нефти, а их суммарное содержание может быть от 25 до 75% [12, 13].

Арены, или же ароматические соединения, содержащие одно бензольное кольцо, в нефти представлены бензолом или его гомологами. Эти соединения могут присоединять водород, поэтому считается ненасыщенными. В зависимости от месторождения в составе нефти может быть от 15 до 50% аренов [14].

Так же в составе нефти встречаются асфальтены, неуглеводородные и минеральные соединения. Количество смолисто-асфальтеновой части в нефти определяет её вязкость [14, 15].

1.2 Загрязнение экосистем нефтепродуктами

Экосистемы сильно меняют свои физико-химические и биологические свойства под действием нефти и нефтепродуктов. Попадание этих поллютантов в почву, воду и воздух происходит в ходе добычи, транспортировки и переработки нефти. С каждым годом количество загрязнений увеличивается, обостряя экологические проблемы [16].

Нефть может негативно влиять на все компоненты биогеоценозов. В случае почвы, загрязнение нефтью вызывает изменения биохимических и морфологических характеристик. Например, изменяется цвет и состояние верхнего и нижнего профиля почвы. Ухудшается способность удерживать влагу, меняется газообмен. Все эти процессы негативно влияют на почвенный биоценоз. В первую очередь страдают растения, так как нефтяное загрязнение способно вызвать значительную задержку в росте и развитии ростков. Далее опасному воздействию подвергаются животные, некоторые могут использовать в пищу отравленные химикатами растения, а другие используют загрязненную воду, чтобы утолить жажду [17]. Во всех этих случаях нефтепродукты попадают в организм и наносят существенный

вред. Возвращаясь к растениям, важно обозначить, что все зависти от уровня загрязнения. Так называемые растения – фиторемедианты способны переживать неблагоприятные условия, а также дополнительно очищать почву, аккумулируя токсичные соединения и перерабатывая их [18].

Часто при попадании нефти в почву наблюдается повышенная биохимическая активность почвенной микробиоты, поскольку нефть и нефтепродукты являются субстратом для некоторых бактерий и микромицет. Резистентные формы дают скачок в количестве, а чувствительные к данному виду поллютантов микроорганизмы погибают. Актиномицеты, аммонифицирующие бактерии и некоторые грибы способны активно развиваться в присутствии нефти, а микроорганизмы, перерабатывающие азотсодержащие вещества, наиболее чувствительны и их развитие ингибируется. Так же при хроническом загрязнении зачастую происходит уменьшение биоразнообразия почвенных микроорганизмов [19,20].

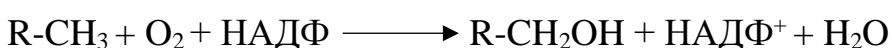
1.3 Микробная переработка нефти и нефтепродуктов

Нефть и нефтепродукты – это ценное сырье для промышленности. Такие источники углеводов активно используются для различных производств, что приводит к ухудшению экологической обстановки [21, 22]. Проблема загрязнения углеводородами решается благодаря бактериям, которые могут ассимилировать нефть и использовать её в качестве субстрата [23]. Важно досконально изучить биохимические процессы, происходящие внутри бактериальных клеток, чтобы найти новые пути борьбы с нефтяными загрязнениями.

Для аэробной утилизации углеводов бактерии используют два типа оксиредуктазных ферментов – монооксигеназа и диоксигеназа [24].

Монооксигеназы способны окислять алканы до первичных и вторичных спиртов.

В первом случае фермент преобразует концевой атом алкана:



Во втором случае монооксигеназа окисляет алканы по второму атому углерода, что приводит к образованию вторичного спирта ($R - CHOH - R'$).

Механизм действия диоксигеназы основан на том, что фермент окисляет концевой атом алкана, после чего образуется гидропероксид, а затем первичный спирт [23, 24]:



Полученные метаболиты могут преобразовываться разными путями. Вторичные спирты переходят в кетоны, а затем превращаются в ацетат и первичные спирты. Из первичных спиртов образуются жирные кислоты, которые под действием β -окисления превращаются в ацетил-КоА. Данный метаболит затем включается в цикл трикарбоновых кислот [25].

Чтобы осуществить переработку ароматических соединений бактерии используют два типа диоксигеназ. Однако перед этим арены должны преобразоваться в катехол или прокатеховую кислоту [26].

На рисунке 2 показан механизм расщепления ароматического кольца под действие диоксигеназы 1-го типа. Такой процесс называется орто-расщеплением и приводит к тому, что ароматическое кольцо разрывается между двумя гидроксильными атомами углерода:

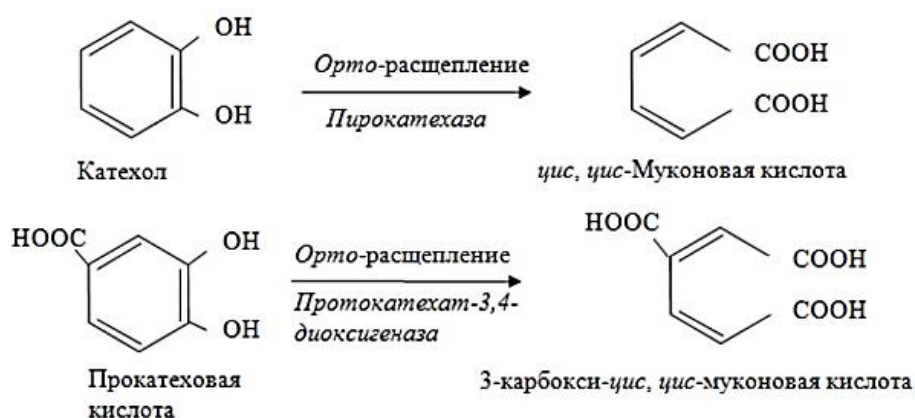


Рисунок 2 – Орто - расщепление

После орто-расщепления образуются муконовые кислоты, которые превращаются в 3-оксоадипиновую кислоту. Данное соединение

расщепляется с образованием сукцинил-КоА и ацетил-КоА, которые включаются в цикл Кребса.

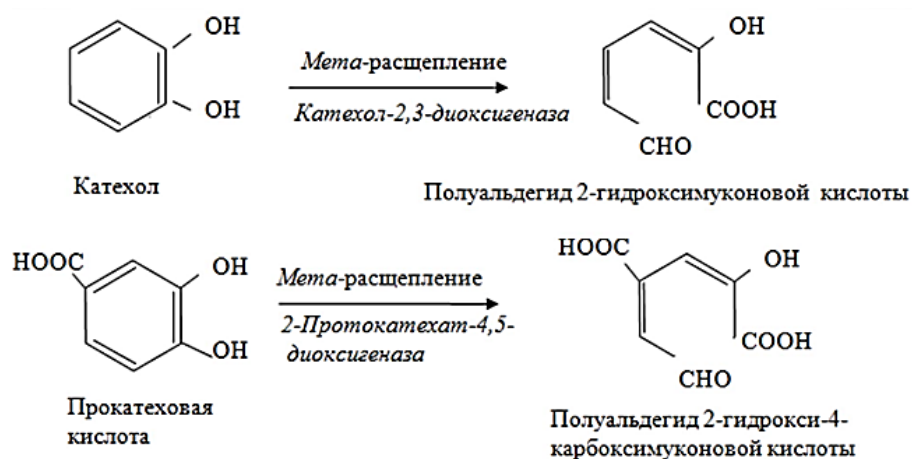


Рисунок 3 – *Мета* - расщепление

Мета-расщепление (рис.3) приводит к тому, что под действием диоксигеназы 2-го типа ароматические кольца расщепляются между гидроксильрованными и негидроксильрованными атомами углерода. В этом случае образуются полуальдегиды, которые в дальнейшем превращаются в различные вещества, участвующие в промежуточном обмене [27].

Быстрее всего микроорганизмы способны расщеплять алканы и алкены. Циклопарафины тяжело поддаются биодegradации, что обусловлено сложностью их строения. Поэтому скорость распада нефти и нефтепродуктов в почве во многом зависит от их углеводородного состава [28]. Микроорганизмы – нефтедеструкторы широко распространены во многих биотопах. Поиск и практическое применение таких грибов и бактерий способно решить множество биотехнологических проблем, например, в сфере экологии [29].

Важно понимать, что переработка углеводов микроорганизмами исследована недостаточно. Данный механизм является сложным и многофакторным, его активность способна меняться под действием температуры, влажности и многих других физико-химических факторов. Так

же особенности метаболизма микроорганизмов влияют на то, что бактерии и микромицеты проявляют избирательный характер в отношении некоторых углеводов [30, 31].

1.4 Современные подходы к борьбе с нефтяными загрязнениями

В настоящее время методы очистки делят на несколько категорий: физические, химические и биологические методы очистки.

Газофазная экстракция, воздействие ультразвуком, сжигание грунта и различные электротехнические способы – основные физические методы, применяемые на данный момент. Недостатком этих методов является высокая стоимость, а также возможность вторичного загрязнения [32].

Часто для реабилитации экосистем используют химические методы. В таком случае используют поверхностно-активные вещества или окислители. Агрессивность данных соединений (активный кислород и хлор, щелочные растворы) может приводить к тому, что почве требуется дополнительный период рекультивации, чтобы избавиться от вторичного загрязнения. Химическая очистка так же подразумевает проведение промывки почвы. После данного этапа большое количество воды нуждается в очистке и переработке, что является существенным минусом в использовании химических методов ремедиации [33].

Перспективными и безопасными методами считаются методы биоремедиации. Их можно разделить на методы рекультивации с использованием микроорганизмов (биологическая стимуляция, естественное ослабление, ферментативный метод) и фиторемедиацию, которая подразумевает использование растений. Для микробной реабилитации биотопов важно выделить микроорганизмы-нефтедеструкторы, которые способны использовать углеводороды в качестве единственного источника углерода [34]. Еще одним методом биологической рекультивации является фиторемедиация, которую часто сочетают с микробиологической реабилитацией почв. Фиторемедиация основана на метаболических

процессах растений. Они способны поглощать, аккумулировать и трансформировать загрязнители. При подборе биологической технологии ремедиации почв от нефтепродуктов основное внимание следует уделять подбору растений, способных эффективно преобразовывать загрязнения совместно с микроорганизмами – деструкторами [35]. Таким образом, исследование возможностей применения растений в сочетании с нефтеокисляющими микроорганизмами является одной из актуальных задач современной экологической биотехнологии.

1.5 Характеристика углеводородокисляющих бактерий

По некоторым данным количество УВОМ в почве составляет 0,1% от общего числа почвенных микроорганизмов. Количество таких бактерий, увеличивается при попадании в биоценоз нефти или нефтепродуктов [36].

Для увеличения эффективности биоремедиационных мероприятий важно выделять и использовать штаммы микроорганизмов-нефтедеструкторов. Сейчас описано огромное количество штаммов, которые могут быть перспективными для утилизации нефти. Активными нефтедеструкторами считаются бактерии из следующих родов: *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Bacillus* и др. [37]

Наиболее активные в деструкции нефти микроорганизмы, которые чаще остальных используются в биоремедиации, относятся к родам: *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Micobacterium*, *Pseudomonas* и др. [37,38].

Рода *Pseudomonas* и *Acinetobacter*, а так же нокардиоформные грамположительные бактерии отмечаются в научной литературе, как микроорганизмы, которые играют наиболее важную роль при естественном ослаблении нефтяной нагрузки в загрязненных экосистемах [39].

Для эффективной переработки углеводов бактерии должны иметь определенные ферменты. Оксиредуктазы, в частности монооксигеназы и диоксигеназы, играют ключевую роль в биохимических превращениях углеводов в бактериальных клетках. Помимо ферментов, большое значение имеет группа веществ под названием биосуфрактанты. Для их выработки в микробных клетках должны быть определенные плазмиды [39,40].

Бактерии активно вырабатывают различные биосуфрактанты за пределы своих клеток в огромных количествах. Эти вещества, известные как поверхностно-активные вещества (ПАВ), представлены разнообразными соединениями, такими как липопептиды, липопротеины, полимеры и гликолипиды [41]. Их главное свойство заключается в способности растворять нефтепродукты, делая их более доступными для микробных процессов восстановления. Эти вещества работают по принципу улучшения эмульгирования углеводов, что, в свою очередь, способствует повышению эффективности биоремедиации. Таким образом, можно сказать, что бактерии играют важную роль в процессах очистки и восстановления загрязненных участков, благодаря своей способности производить такие полезные вещества [42].

1.6 Использование растений для фиторемедиации нефтяных загрязнений почвы

В целом нефть и нефтепродукты оказывают негативное влияние на растения: снижается всхожесть, рост и развитие растений, ухудшается дыхательная, фотосинтетическая активность и другие показатели. Высокие концентрации нефти (от 7%) снижают всхожесть на 73 % вплоть до полной гибели семян [43]. Однако в некоторых работах отмечается, что небольшие концентрации нефти могут оказывать стимулирующее действие на рост и развитие растений [44, 45]. Такое явление может объясняться тем, что в

нефти и нефтепродуктах содержатся минеральные вещества, положительно влияющие на прорастание семян.

Несмотря на отрицательное влияние нефти на растения, среди них есть устойчивые к загрязнению виды, которые могут быть использованы для фиторемедиации. Такие растения способны ассимилировать, удалять и преобразовывать нефть из почвы, а также влиять на почвенную микробиоту, активируя её метаболические свойства в отношении углеводов. Наиболее распространёнными фиторемедиантами являются злаковые растения. Так же положительная динамика отмечается при использовании растений из семейства Бобовых (*Fabaceae* Lindl.) [46]. Наиболее часто в литературе упоминаются растения рода клевер (*Trifolium*), пшеница яровая (*Triticum vulgare* L.), горчица белая (*Sinapis alba* L.) и вика посевная (*Vicia sativa* L.) [46, 47].

На данный момент фиторемедиация считается самым финансово легким методом рекультивации почв, поскольку не требует экскавации загрязнённых почвенных масс, а также может применяться на огромных территориях. Растения не требуют специальных условий культивирования, не вызывают вторичного загрязнения экосистем и защищают почвы от эрозии [47].

Фиторемедиация может подразделяться на несколько типов. Первый, это ризодеградация. В данном случае растения выступают, как стимулирующий фактор для ризосферной микрофлоры. Воздействуя на почвенных бактерий через корневой экссудат, растения усиливают метаболическую активность микроорганизмов, что ведет к увеличению темпов переработки углеводов [47, 48]. Еще одним положительным фактором для утилизации загрязнений является то, что корни растений рыхлят землю, тем самым увеличивая рост аэробных бактерий, которые способны осуществлять аэробное разложение углеводов с помощью оксидоредуктаз [24, 43]. Сами растения также могут осуществлять

фитодеградацию, однако темпы этого процесса в отношении нефтяных загрязнений невелики [49].

Таким образом фиторемедиацию следует рассматривать, как дополнение к основным методам рекультивации, которое способно увеличивать скорость биodeградации нефтепродуктов в почве.

2 Объекты и методы исследования

2.1 Объекты исследования

Объектом исследования в настоящей работе были 15 штаммов бактерий, выделенных из нефтезагрязненной садовой почвы (16 вес.% загрязнения): *Achromobacter spanius*, *Achromobacter denitrificans*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Brevibacillus centrosporus*, *Cellulosimicrobium cellulans*, *Micrococcus roseus*, *Microbacterium hydrocarbonoxydans*, *Rhodococcus erythropolis*, *Sterotrophomonas rhizophila*, *Streptomyces spp.*, *Streptomyces violanceoruber*, *Paenibacillus rhizospharae*, *Pseudomonas synxantha*.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Выделение микроорганизмов из нефтезагрязненной почвы

Для выделения бактерий, устойчивых к нефтяному загрязнению, в садовую почву (садовый участок в микрорайоне Ветлужанка, г. Красноярск) вносили сырую нефть в концентрации 16 вес.%. Через 2 месяца проводили высеv почвенных разведений на агаризованную питательную среду Nutrient agar (HiMedia, Индия). Чашки Петри инкубировали в течении 5 дней при температуре 30 °С. Для получения чистых культур проводился отбор доминирующих по количеству колоний на чашках Петри, культуры изолированных колоний переносили бактериальной петлей на скошенный агар (МПА). Полученные чистые культуры подлежали дальнейшим исследованиям и идентификации.

2.2.2 Исследование свойств и идентификация выделенных микроорганизмов

Для первичной идентификации микроорганизмов изучали их морфологические, биохимические и культуральные свойства стандартными методами [50]. Определяли морфологию клеток, спорообразование,

подвижность, грампринадлежность, наличие различных ферментов (каталаза, оксидаза, амилаза, липаза, протеаза), а так же оценивали способность выделенных бактерий утилизировать различные углеводы.

Для изучения морфологии клеток применялась прижизненная микроскопия препарата из культуры, которая была окрашена метиленовым синим (рис. 4). Этот метод так же позволял определить подвижность и спорообразование изучаемого микроорганизма.

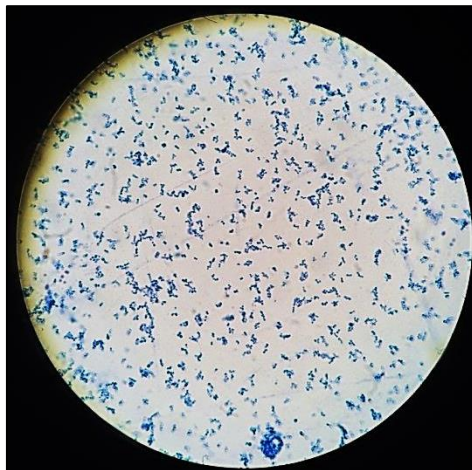


Рисунок 4 – Морфология клеток, окрашенных метиленовым синим

При оценке грампринадлежности использовался экспресс-метод Грегерсена. Для этого петлю бактериальной культуры суспендировали на предметном стекле в капле 3% раствора КОН. Если культура приобретала слизистую текстуру и тянулась вслед за петлей, то результат считался положительным, такие микроорганизмы относились к грамотрицательным. При отсутствии реакции культура определялась, как грамположительная. Данный метод основан на способности клеточных стенок грамположительных бактерий сохранять свою структуру при воздействии на них гидроксида калия.

Оценка протеолитической, амилалитической и липазной активности исследуемых культур проводилась на дифференциально-диагностических средах. При выявлении наличия липазы использовалась желточный питательный агар. Для этого в питательный агар, остуженный до 40 - 45 °С,

добавляли желточный раствор, а затем разливали его в чашки Петри. Далее на поверхность застывшего агара штрихом проводили посев бактериальной культуры. Чашки инкубировали 7 дней. При положительной реакции вокруг выросшей колонии обнаруживался маслянистый ободок.

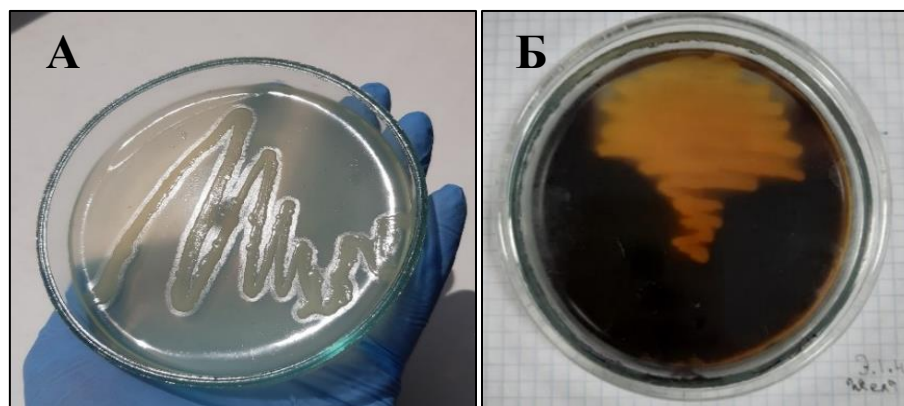


Рисунок 6 – Определение липазной (А) и амилолитической (Б) активности бактерий на специальных средах

Амилолитическая активность определяли на питательном агаре, в который дополнительно вносили растворимый крахмал (1,5 – 3 %). Среду разливали в стерильные чашки Петри, в которые затем проводили посев штрихом через центр бактериальной культуры. Чашки инкубировали в течение 7 дней при 37 °С. Для обнаружения амилазы на поверхность питательного агара, с выросшей на нем культурой, наносилось 3 мл раствора Люголя. При появлении прозрачных зон вокруг штриха делали вывод о том, что исследуемая культура имеет амилолитическую активность.

Для обнаружения протеазы использовалась мясопептонная желатина. Для приготовления среды в 100 мл питательного бульона добавляли 15 г желатины. Среду разливали в пробирки, а затем проводили посев уколом исследуемой культуры. Культивирование осуществлялось при комнатной температуре, в течение 7 дней. Протеолитическая активность определялась при разжижении культурой желатины.

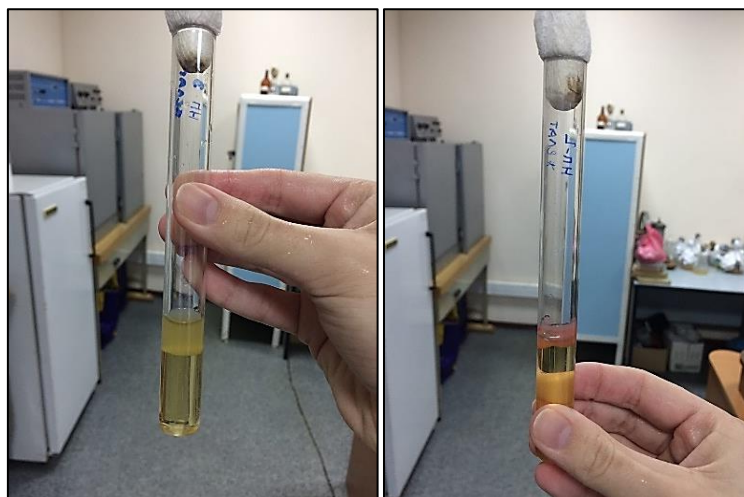


Рисунок 7 – Тест на протеолитическую активность

Так же при изучении биохимических свойств культуры проводилась оценка каталазной и оксидазной активностей. Фермент каталазу определяли с помощью экспресс-метода с использованием 3% раствора пероксида водорода. Для этого на предметное стекло наносили каплю раствор, а затем в него вносили бактериальную культуру. При наличии фермента протекала активная реакция с образованием пузырьков газа. Отрицательным результатом служило отсутствие какой-либо реакции в течение 20 секунд. Оксидазную активность оценивали с помощью тест-полосок окситест (MIKRO-LA-TEST).

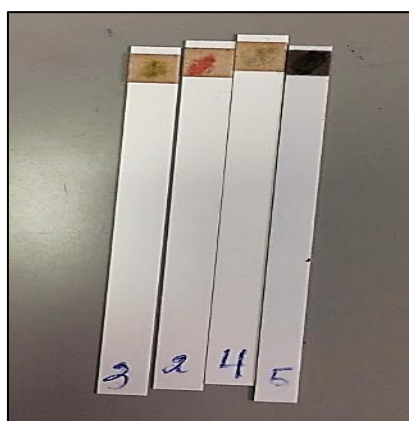


Рисунок 8 – Оксидазный тест на полосках окситест (MIKRO-LA-TEST)

Среды Гисса использовались для оценки способности микроорганизмов окислять различные углеводы. Данные среды включают в себя панкреатический гидролизат, различные углеводы (лактоза, мальтоза,

манит, глюкоза) и индикатор. Перед посевом среду варили, разливали в пробирки и добавляли поплавков для оценки газообразования. Затем в пробирки вносили бактериальную культуру. Пробирки культивировали в течение 7 дней при 30 °С. Изменение окраски среды свидетельствовало о наличии сахаролитических ферментов.

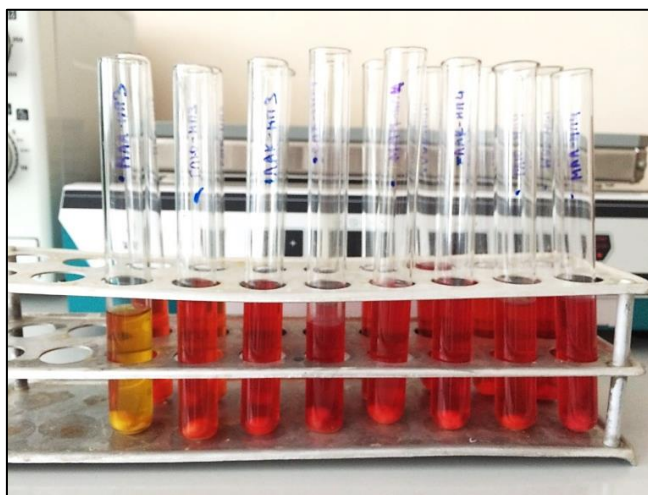


Рисунок 9 – Оценка способности микроорганизмов окислять различные углеводы на средах Гисса

Видовую идентификацию микроорганизмов проводили с помощью метода матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS) на масс-спектрометре Bio Type Microflex LT/SH (Bruker, Германия) в КГБУЗ «Красноярский краевой клинический центр охраны материнства и детства».

Для анализа использовались чистые культуры изучаемых бактериальных штаммов, которые были аккуратно нанесены на поверхность специально разработанного планшета для проведения MALDI-TOF масс-спектрометрии (MTP 384 massive, производства компании «BrukerDaltonics» из Германии). Каждый из образцов был покрыт двумя микролитрами матричного раствора, содержащего α -CHCA (также от «BrukerDaltonics», Германия). В состав матричного раствора входила 2,5% трифторуксусной кислоты и 50% ацетонитрила. Затем планшет оставляли на 5 минут для

высыхания, что способствовало формированию кристаллов на поверхности. В качестве контрольного образца и внешнего стандарта служила суспензия штамма *Escherichia coli* DH5a.

Для анализа каждого образца было применено 50 импульсов лазера, чтобы получить масс-спектры. Параметры оборудования были настроены для диапазона масс-зарядов от 2000 до 20 000. Для внутренней калибровки этого диапазона использовались известные значения масс белков *E.coli*. Каждый образец наносился на три ячейки, после чего для каждого из них записывался спектр, составленный из 10 отдельных спектров (500 импульсов лазера). Обработка и анализ полученных масс-спектров осуществлялись с помощью программного обеспечения от компании BrukerDaltonics (Германия): flexControl 2.4 (Build 38). При интерпретации результатов считалось, что пики на спектрах соответствуют отдельным молекулам белков, а определенные массы представляют собой массы целых белков. Дальнейшая идентификация также проводилась автоматически с применением специализированного программного обеспечения.

2.2.3 Оценка использования бактериями сырой нефти в качестве единственного источника углерода

Для оценки способности исследуемых микроорганизмов использовать нефть в качестве единственного источника углерода был использован метод высева бактерий на агаризованную минеральную среду с добавлением стерильной сырой 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 водопроводная. На агаризованную среду наносили и распределяли шпателем 1 мл стерильной нефти, затем высевали суспензию микроорганизмов. Так же проводили посев на минеральную среду без добавления нефти, для исключения автотрофного роста. Чашки Петри с посевами инкубировали при 30 °С. Фиксировали рост микроорганизмов на 5-7 сутки.

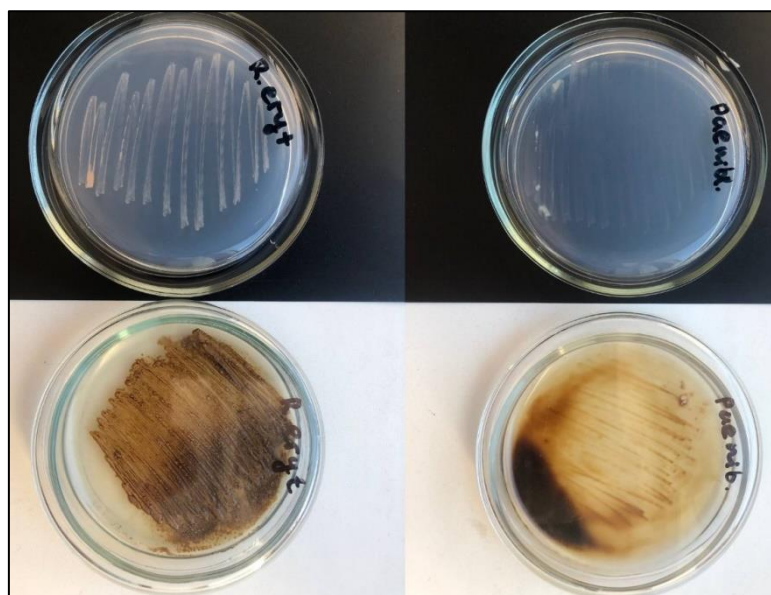


Рисунок 10 – Рост микроорганизмов на агаризованной минеральной среде с добавлением и без добавления стерильной нефти

Так как некоторые микроорганизмы, возможно, относились к олигокарбофильной группе, способной развиваться в условиях незначительного содержания доступных углеродсодержащих соединений, был проведен посев некоторых микроорганизмов на жидкую 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; вода водопроводная. В колбы с 50 мл минеральной среды добавляли 0,3 мл сырой нефти, затем в колбы вносили петлей культуру исследуемых бактерий. Инкубация протекала при 28 °С в шейкере-инкубаторе JEIO TECH SL-600 (Корея) в течение 7 суток.

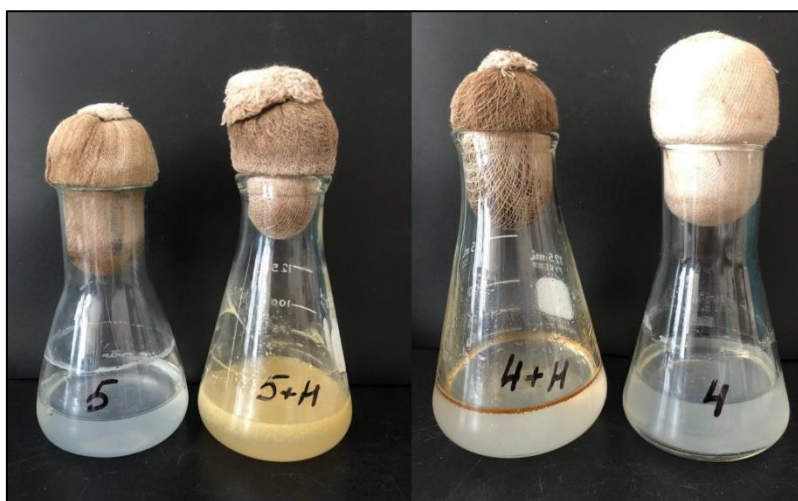


Рисунок 11 – Рост микроорганизмов на жидкой минеральной среде с добавлением и без добавления стерильной нефти

2.2.4 Оценка способности выделенных штаммов бактерий к деградации нефти в почве

В пластиковые контейнеры объемом 100 мл насыпали 100 г садовой почвы 50%-ной влажности и вносили сырую нефть в количестве 5 мл. Затем в контейнеры вносили 6,5 мл суспензии чистой культуры бактерий с титром $1,5 \cdot 10^8$ кл/мл. Контейнеры выдерживали при комнатной температуре. Содержание сырой нефти в почве оценивали на 5 и 10 сутки гравиметрическим методом. Для этого делали навески почвы по 10 г из каждого контейнера, взвешивали на аналитических весах (Ohaus, США). Далее почву переносили в колбы и добавляли 10 мл гексана, перемешивали и доливали еще 10 мл. Полученные образцы оставляли на 10 минут, а затем полученную смесь пропускали через бумажный фильтр в заранее взвешенные колбы. После этого колбы оставляли в сушильном шкафу на 24 часа, до полного испарения гексана. Остаточное содержание нефти определяли взвешиванием на аналитических весах по разнице массы колб.

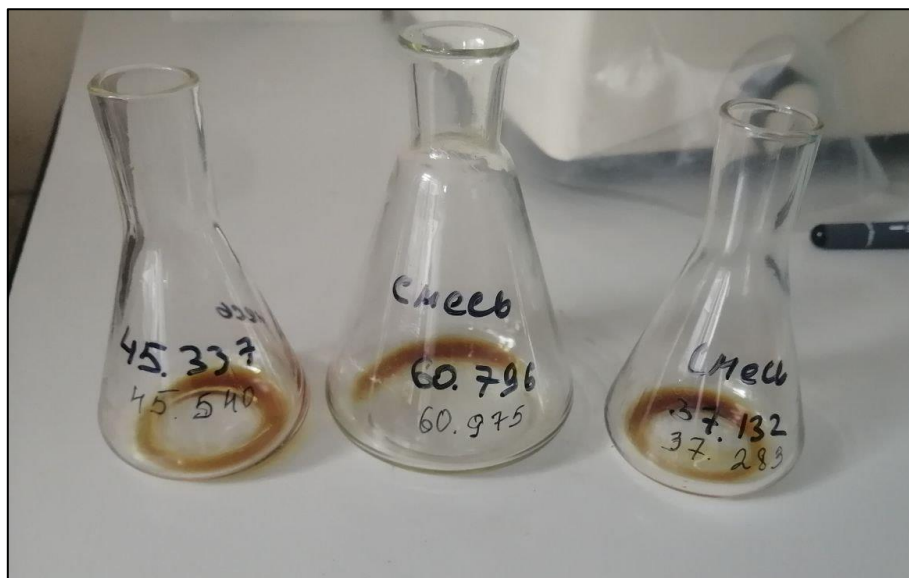


Рисунок 12 – Нефть, выделенная из почвы после экспозиции с бактериями

2.2.5 Оценка фитотоксичности нефтезагрязненной почвы после обработки бактериями

Для оценки фитотоксичности загрязненной почвы после обработки суспензиями выделенных микроорганизмов использовали метод проращивания тестовых культур растений [51]. Для этого 400 г почвы засыпали в пластиковые непрозрачные контейнеры. Затем вносили нефть в количестве 6 вес.%. В каждый контейнер добавляли по 5 мл водной суспензии бактерий (оптическая плотность 0,5 по МакФарланду) в конечной концентрации 1,25 млн. КОЕ в 1 г почвы. Через 14 суток в контейнеры засеивали пшеницу яровую по 30 семян. В качестве отрицательного контроля семена засеивали в незагрязненную почву. В положительном контроле пшеницу засеивали в контейнеры с добавлением сырой нефти без дополнительного внесения микроорганизмов. Через 7 дней после посева проводили оценку всхожести семян, а спустя 14 суток определяли биомассу надземной части и длину проростков.



Рисунок 13 – Ростки пшеницы яровой на 14 сутки после посева

2.2.6 Оценка действия выделенных штаммов бактерий на ризосферную микрофлору пшеницы

Микробиологический анализ ризосферной почвы пшеницы проводили общепринятыми методами почвенной микробиологии (Нетрусов, 2005). Анализ проводили в день высева семян и на 14 сутки после посева. Общую численность бактерий и микромицетов определяли при высеве разведений почвы на мясопептонный агар (МПА) и среду Чапека (с добавлением антибиотика имипенема). Чашки с МПА инкубировали 5 суток при 30 °С, чашки со средой Чапека – 7-10 суток при 25 °С. Далее проводили подсчет колоний бактерий и микромицетов. Общую численность микроорганизмов (КОЕ в 1 г почвы) определяли по формуле:

$$\text{ОМЧ} = (N \cdot K) / (V \cdot M), \text{ где}$$

N – среднее количество колоний на чашке; K – коэффициент разведения; V – объем засеянной суспензии; M – масса образца почвы.

3 Результаты исследования

3.1 Видовое разнообразие и характеристика аборигенных почвенных бактерий, устойчивых к нефтяному загрязнению

Страницы 29-45 изъяты в связи с авторским правом.

Заключение

По результатам исследований были сделаны следующие выводы:

1) Из почвы, загрязненной нефтью, было выделено и идентифицировано 15 изолятов бактерий: из них 5 видов относились к классу *Proteobacteria* (*Achromobacter spanius*, *Achromobacter denitrificans*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas synxantha*, *Stenotrophomonas rhizophila*), 4 вида – к классу *Bacilli* (*Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Brevibacillus centrosporus*, *Paenibacillus rhizospharae*) и 6 видов – к классу *Actinomycetia* (*Cellulosimicrobium cellulans*, *Micrococcus roseus*, *Microbacterium hydrocarbonoxydans*, *Rhodococcus erythropolis*, *Streptomyces* sp., *Streptomyces violaceoruber*).

2) Виды *Rhodococcus erythropolis*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Streptomyces violaceoruber* и *Pseudomonas synxantha* могут использовать нефть в качестве единственного углеродного субстрата, а также достоверно уменьшают количество нефти в почве. Смесь данных бактерий также эффективно снижала количество нефти в почве – на 85% от исходной концентрации за 10 суток.

3) Виды *Rhodococcus erythropolis*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Streptomyces violaceoruber* и *Pseudomonas synxantha*, а также их смесь снижали фитотоксичность почвы, загрязненной нефтью, и не оказывали значительного ингибирующего действия на прорастание и развитие яровой пшеницы.

4) Использование бактериального консорциума из таких видов, как *Rhodococcus erythropolis*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Streptomyces violaceoruber* и *Pseudomonas synxantha* может быть рекомендовано для восстановления почв, загрязненных нефтью, в том числе совместно с фиторемедиантами.

Список использованных источников

1. Полонская Д. Е. и др. Влияние уровня нефтезагрязнения на состав почвенных микроорганизмов //Вестник Красноярского государственного аграрного университета. 2011. № 7. С. 47-52.
2. Шаркова С. Ю., Полянскова Е. А., Парфенова Е. А. Состояние микробного комплекса почв при нефтезагрязнении //Известия Пензенского государственного педагогического университета им. ВГ Белинского. 2011. № 25. С. 614-617.
3. Рязанова Т. В., Федорова О. С., Лоскутов С. Р. Деструкция нефти иммобилизованной микрофлорой //Журнал Сибирского федерального университета. Химия. 2018. Т. 11. № 2. С. 184-194.
4. Экспериментальные исследования эффективности фиторемедиации почв, загрязнённых нефтью, нефтепродуктами и тяжёлыми металлами / В. В. Заболотских, А. В. Васильев, С. Н. Танких, Е. Е. Карпович // Академический вестник ЕЛРПГ. – 2020. – Т. 5, № 2(12). – С. 25–47.
5. Никонов А. Н., Потапова С. О. Нефтяная промышленность, как один из серьезных загрязнителей окружающей среды // Пожарная безопасность: проблемы и перспективы. 2018. №9. – С. 666–673.
6. Владимиров В. А. Разливы нефти: причины, масштабы, последствия // Стратегия гражданской защиты: проблемы и исследования. 2014. №1. – С. 217–228.
7. Шамраев А. В., Шорина Т. С. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды //Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – №. 6. С. 642–645.
8. Б. Тиссо, Д.Вельте. Образование и распространение нефти. Пер. с англ. А.И. Конюхова, Г. В. Семерниковой, В. В. Чернышева под ред. Р.Б. Сейфуль-Муллюкова. - М.- Изд-во Мир, 1981.- С. 502.
9. Проскурякова, В. А. Химия нефти и газа / В. А. Проскурякова, А. Е. Драбкина. – Л.: Химия, 1989. – С. 447.

10. Химия нефти и топлив: учебное пособие / Е. В. Бойко. – Ульяновск: УлГТУ, 2007.– С. 60.
11. Состав нефти и классификация [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.mnpu.ru>
12. Кузнецов А. Е., Градова Н. Б. Научные основы экобиотехнологии. – М.: Мир, 2006. – С. 504.
13. Баженова О. К., Бурлин Ю.К., Соколов Б. А., Хаин В. Е. Геология и геохимия нефти и газа. - Учебник. Под ред. Б. А. Соколова. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Изд-во Московского университета; Издательский центр «Академия», 2004. — С. 415.
14. Владимиров В. А. Разливы нефти: причины, масштабы, последствия // Стратегия гражданской защиты: проблемы и исследования. 2014. №1. – С. 217–228.
15. Геология нефти и газа: учебное пособие / А.Е. Ковешников. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2010. – 114 с.
16. Шамраев А. В., Шорина Т. С. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – №. 6. С. 642–645.
17. Кольцова Т. Г., Сунгатуллина Л.М., Григорьян Б.Р., Башкиров В. Н. Влияние нефтяного загрязнения на фитотоксичность дерново-карбонатных почв // Вестник Казанского технологического университета. 2015. №1. С. 376–382.
18. Исакова Е. А. Особенности воздействия нефти и нефтепродуктов на почвенную биоту // Colloquium-journal. 2019. №12. - С. 7–10.
19. Ali, Wasen. (2019). Biodegradation and phytotoxicity of crude oil hydrocarbons in an agricultural soil. Chilean journal of agricultural research. 79. p 266-277.
20. Кузнецов А. Е., Градова Н. Б. Научные основы экобиотехнологии. – М.: Мир, 2006. – С. 504.

21. Тетельмин Б.В., Язев В. А. Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. Долгопрудный: Издательский Дом «Интеллект», 2009. – С. 352.

22. Метаболизм бактерий - Готтшалк Г. Пер. с англ. Г. П. Мирошниченко и Т.Ю. Переслени, под ред. Е. Н. Кондратьевой- М.- Изд-во Мир, 1982 г. – С. 310.

23. Преобразование нефтей микроорганизмами // Тр. ВНИГРИ. Под редакцией Б.Г. Хотимского и А.И. Акопиан. – Л.: ВНИГРИ, 1970. – С. 281.

24. Микробиология: Учеб. пособие для студентов биологических специальностей / В. В. Лысак. - Мн.: БГУ, 2005. – С. 426.

25. Бабаев Э. Р., Мовсумзаде М.Э. Преобразование нефти в процессе её микробиологической деградации в почве // Башкирский химический журнал, 2009. – Т.16. - №3. – С. 80–87.

26. Тимергазина, И. Ф. К проблеме биологического окисления нефти и нефтепродуктов углеводородокисляющими микроорганизмами / И. Ф. Тимергазина, Л. С. Переходова // Нефтегазовая геология. Теория и практика. – 2012. – Т. 7. – № 1. – С. 15.

27. Скворцов, А. П. Способы очистки почвы после аварийных разливов нефти и нефтепродуктов / А. П. Скворцов // Политехнический молодежный журнал. – 2020. – № 2(43). – С. 8.

28. Lyulin, Sergey V. et al. “Computer Simulation of Asphaltenes.” *Petroleum Chemistry* 58. – 2018. – p. 983-1004.

29. И.Д. Созина, А.С. Данилов Микробиологическая ремедиация нефтезагрязненных почв // Записки Горного института. 2023. №260. – с. 297 – 312.

30. Никулина А. Р. Исследование способности бактерий-нефтедеструкторов восстанавливать загрязнённые нефтью почвы // Наука без границ. 2019. - № 7(35). - С. 125-128.

31. Ветрова А.А., Забелин В.А., Иванова А.А., Адаменко Л.А., Делеган Я.А., Петриков К.В. Биодegradация нефти консорциумом штаммов-

нефтедеструкторов в лабораторных модельных системах // Юг России: экология, развитие. 2018. Т.13, N1. С.184-198.

32. Status of Microbial Remediation Technology in Petroleum Contaminated Land Longfei Xia IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 300. – 2019. – p. 8.

33. Германова С. Е., Самброс Н.Б., Петухов Н. В., Рыжова Т. А. Методы очищения почв от нефтепродуктов // МСХ. 2019. №4. – С. 63–65.

34. Ma Hong-Mei, Zhu Zhi-Liang. Research progress and application of surfactants in chemical cleaning. CLEANING WORLD, 2005. - p. 22–27.

35. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводов в окружающей среде (обзор) / Т.В. Коронелли // Прикладная биохимия и микробиология. -1996.- 32, № 6.- С. 579–585.

36. Середина В.П. Загрязнение почв: учебное пособие. – Томск: Издательский Дом Томского государственного университета, 2015. – С. 346.

37. Рогозина Е. А., Андреева О. А., Жаркова С. И., Мартынова Д. А., Орлова Л. А. Сравнительная характеристика отечественных биопрепаратов, предлагаемых для очистки почв и грунтов от загрязнения нефтью и нефтепродуктами // Нефтегазовая геология. Теория и практика. 2010. №3. – С. 18.

38. Могилевская, И. В. Углерододокисляющие микроорганизмы для биологической очистки сточных вод и загрязненных почв / И. В. Могилевская, И. В. Владимцева // Современные наукоемкие технологии. – 2005. – № 9. – С. 67–68.

39. Гоголева О. А., Немцева Н. В. Углерододокисляющие микроорганизмы природных экосистем // БОНЦ УрО РАН. 2012. №2. – С. 8.

40. Rosenberg, E., Ron, E. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. Appl Microbiol Biotechnol 52. – 1999. – p. 154–162

41. Muthukamalam S, Sivagangavathi S, Dhrishya D, Sudha Rani S. Characterization of dioxygenases and biosurfactants produced by crude oil degrading soil bacteria. Braz J Microbiol. 2017. – p. 637–647.

42. Mulligan, Catherine N. "Environmental applications for biosurfactants". *Environmental Pollution*. 133 (2). 2005. – p. 183–198.
43. Степанова А.Ю., Соловьева А.И., Гладков Е.А. Влияние нефти как неблагоприятного фактора на растения и фиторемедиация нефтезагрязненных территорий // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2017. Т. 13. № 3. С. 51–57.
44. Киреева Н.А., Мифтахова А.М., Салахова Г.М. Рост и развитие растений яровой пшеницы на нефтезагрязненных почвах и при биоремедиации // *Агрохимия*. – 2006. – Т. 1. – С. 85–90.
45. Shahsavari E. et al. Tolerance of selected plant species to petrogenic hydrocarbons and effect of plant rhizosphere on the microbial removal of hydrocarbons in contaminated soil // *Water, Air and Soil Pollution*. – 2013. – Vol. 224(4). – P. 1–14.
46. Егорова Д., Бузмаков С. Биоремедиация нефтезагрязненных темно-серых почв с использованием бактериальных и растительных агентов // *Экология и промышленность России*. – 2022. – 26(3) – с. 17-21.
47. Утомбаева, А. А., Зайнулгабидинов, Э. Р., Кузнецова, Т. В., & Петров, А. М. (2022). СКРИНИНГ РАСТЕНИЙ ДЛЯ ФИТОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ // *Российский журнал прикладной экологии*, (1), с. 68–75.
48. Yavari S., Malakahmad A., Sapari N.B. A review on phytoremediation of crude oil spills // *Water, Air, & Soil Pollution*. – 2015. – Vol. 226(8). – P. 226–279.
49. Khan S. et al. Plant-bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils // *Chemosphere*. – 2013. – Vol. 90(4). – P. 1317–1332.
50. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студентов высших учебных заведений. / Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М. и др.; Под ред. Нетрусова А. И. — М.: Академия, 2005. — С. 608.


51. Гамм Т. А., Мосалова Е. И. Особенности роста пшеницы, овса и кукурузы на загрязненных углеводородами почвах // Вестник ОГУ. 2012. №4. - С. 189–195.

52. Водопьянов В. В., Киреева Н. А., Григориади А. С., Якупова А. Б. Влияние нефтяного загрязнения почвы на ризосферную микробиоту и моделирование процессов биodeградации углеводов // Вестник ОГУ. 2009. №6. – с. 545 – 547.

53. Феоктистова Н. В., Марданова А. М., Хадиева Г. Ф., Шарипова М. Р. Ризосферные бактерии // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2016. №2. – с. 207 – 224.

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

Утверждаю
Заведующий кафедрой




 Т.Г. Волова
«24» июня 2024 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**Применение аборигенных штаммов почвенных микроорганизмов
для фитобиоремедиации нефтезагрязненных почв**

06.04.01 – Биология

06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Научный руководитель		проф., д-р биол. наук	С.В. Прудникова
Выпускник			М.А. Редькина
Рецензент		с.н.с., канд. биол. наук	Г.И. Антонов

Красноярск 2024