

на правах рукописи

**ФИЛОНОВ АНДРЕЙ ЕВГЕНЬЕВИЧ**

**МИКРОБНЫЕ БИОПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ОЧИСТКИ ОКРУЖАЮЩЕЙ  
СРЕДЫ ОТ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ В УСЛОВИЯХ УМЕРЕННОГО И  
ХОЛОДНОГО КЛИМАТА**

03.01.06 — Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Пушино — 2016

Работа выполнена в лаборатории биологии плазмид Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, г. Пущино.

Научный консультант: Боронин Александр Михайлович, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, профессор, ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН

Официальные оппоненты: Ившина Ирина Борисовна, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов Уро РАН, профессор, заведующий лабораторией

Цыганков Анатолий Анатольевич, доктор биологических наук, ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии РАН, заместитель директора, заведующий лабораторией

Градова Нина Борисовна, доктор биологических наук, профессор, Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, профессор кафедры биотехнологии

Ведущая организация: Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, г. Москва

Защита диссертации состоится «6» октября 2016 г. в 14 ч. 00 мин. на заседании Диссертационного совета Д 002.121.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук по адресу: 142290, Московская область, г. Пущино, Проспект Науки, 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук и на сайте [www.ibpm.ru](http://www.ibpm.ru)

Автореферат разослан «    »                      2016 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Т. В. Кулаковская

## Актуальность

Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами в настоящее время является глобальной проблемой (Vogt and Richnow, 2013). По величине вредного влияния на экосистемы нефтепродукты и нефть находятся на втором месте после радиоактивного загрязнения (Экологические проблемы топливно-энергетического комплекса России, 2007). Несовершенство технологий добычи, транспортировки, переработки и хранения нефти приводят к ее аварийным разливам, которые достигают 60–70 млн. тонн в год, что составляет около 2% общей мировой добычи. Разливы нефти представляют серьезную опасность, как для экосистем, так и для здоровья человека (Хуе et al., 2015). Следствием нефтяных разливов являются экологические катастрофы во всем мире (Wang et al., 2011). При этом самоочищение почвы при уровне загрязнения нефтью 5 г/кг длится от 2 до 30 лет, а в северных регионах – до 50 лет (Оборин и др., 1988). Последствия нефтяных загрязнений могут оказывать влияние на природные экосистемы в течение десятилетий и даже столетий (Tevvors & Saier, 2010).

Существующие физические, химические и термические методы очистки не только дороги и недостаточно эффективны, но и могут наносить дополнительный вред окружающей среде. Поэтому необходимость разработки и применения новых, эффективных, недорогих и экологически безвредных методов очистки от нефтяных загрязнений очевидна. Показано, что биоремедиация имеет огромный потенциал и конкурентные преимущества, прежде всего, вследствие экологической безопасности и низкой стоимости (Wang et al., 2011).

Способность микроорганизмов к деградации или трансформации углеводов нефти широко известна и позволяет использовать их для биоремедиации загрязнённых территорий. Методы биоремедиации основаны на использовании эндогенных (биоремедиация *in situ* и *ex situ*) или интродуцируемых (биоаугментация) микроорганизмов для очистки загрязненной окружающей среды.

Всё чаще для очистки суши и акваторий от нефтепродуктов и нефти используют биопрепараты, которые содержат жизнеспособные клетки как отдельных штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов («Бациспектин», «Дизойл», «Биодеструктор», «Микромицет», «Путидойл»), так и бактериальные ассоциации («Деворойл», «Биоойл», «Олеворин», «Родер», «Универсал», «Ленойл»). Анализ литературных данных и патентный поиск существующих биопрепаратов показал, что в ряде случаев их недостатками являются малая галотолерантность микроорганизмов в их составе, узкие pH- и температурный диапазоны; часто отсутствуют важные данные о способности микроорганизмов к продукции биоэмульгаторов, об эффективности деструкции высоких концентраций нефтепродуктов и нефти; о наличии кatabолических плазмид в клетках микроорганизмов-деструкторов.

В России большинство месторождений нефти и загрязненных нефтью территорий расположено в северных регионах. Несмотря на многократное увеличение объемов рекультивационных работ, проблема нефтяного загрязнения остается чрезвычайно острой (Чижов, 2008). Работы в направлении фито- и биоремедиации проводятся во многих

странах мира, однако эффективность биоремедиации при низких температурах к настоящему времени мало изучена, а проблема очистки от нефтяных загрязнений до сих пор не решена. Поэтому, особенно актуально изучение процессов биodeградации и биоремедиации, а также разработка эффективных биопрепаратов и технологий очистки от нефтяных загрязнений в условиях холодного и умеренного климата.

### **Цель и задачи исследования**

Целью настоящей работы являлось исследование биodeградации углеводов нефти микроорганизмами-деструкторами при умеренных и низких температурах, изучение культурально-морфологических, физиологических и метаболических свойств этих микроорганизмов, разработка на основе исследуемых бактерий эффективных микробных консорциумов, биопрепаратов и растительно-микробных ассоциаций для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений в условиях умеренного и холодного климата.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие задачи:

1) выделить, охарактеризовать и провести отбор наиболее эффективных психротрофных штаммов – деструкторов углеводов нефти, обладающих способностью к деструкции высоких концентраций нефти и нефтепродуктов в присутствии соли в широком температурном и рН-диапазонах; а также образующих биоэмульгаторы;

2) изучить роль плазмид биodeградации в деструкции углеводов нефти, исследовать горизонтальный перенос катаболических плазмид между микроорганизмами в лабораторных и полевых условиях;

3) изучить образование и свойства биологических поверхностно-активных веществ (биоПАВ), продуцируемых эффективными бактериями-нефтедеструкторами родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*;

4) разработать методы мониторинга интродуцированных в окружающую среду штаммов-нефтедеструкторов с использованием культурально-морфологических признаков, маркеров антибиотикорезистентности и метода геномных фингерпринтов;

5) оптимизировать условия и режимы культивирования эффективных психротрофных бактерий – деструкторов нефти родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*;

6) разработать способы хранения этих микроорганизмов-нефтедеструкторов, обеспечивающие их максимальную выживаемость и деградативную активность;

7) составить микробные консорциумы (опытные образцы биопрепаратов) из отобранных штаммов, обладающих перечисленными в задаче 1 свойствами, для эффективной очистки окружающей среды от нефтепродуктов и нефти в условиях холодного и умеренного климата;

8) сравнить эффективность деструкции нефти в почве полученными опытными образцами биопрепаратов с коммерческими биопрепаратами в лабораторных и полевых условиях;

9) составить эффективные растительно-микробные ассоциации для биоремедиации почв, загрязненных нефтью в условиях холодного и умеренного климата.

### Научная новизна

В развитие научной идеи А.М. Боронина о возможности применения плазмид в экологической биотехнологии разработана концепция выбора штаммов-деструкторов для составления микробных ассоциаций как основы биопрепаратов для биоремедиации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами в условиях умеренного и холодного климата. Углевородоокисляющие микроорганизмы в составе ассоциации должны быть совместимы, способны к деградации высоких концентраций нефти (до 30%) в широком температурном диапазоне (от 4 до 42°C), обладать галотолерантностью и устойчивостью к изменениям значений pH среды, продуцировать эффективные биоПАВ, дополнительными преимуществами штаммов являются наличие катаболических плазмид в их составе и способность к колонизации корней растений.

Впервые оценен вклад катаболических плазмид в биодеградацию нефти в почве и в жидкой минеральной среде. Выделены и охарактеризованы новые плазмиды биодеградации полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) pAP4, pAP5, pAP35, pAP36, pBS3950. Полученные результаты показывают, что штаммы, содержащие конъюгативные плазмиды биодеградации ПАУ интенсифицирует процессы очистки, повышают численность и деструктивный потенциал микробных популяций нефтезагрязненных сайтов. Важным аспектом катаболического потенциала микроорганизмов в процессе деструкции нефти является комбинация «бактериальный хозяин — плаزمид».

Разработан метод мониторинга интродуцированных в почву штаммов-деструкторов родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas*. На основании культурально - морфологических признаков, маркеров антибиотикорезистентности и с применением метода геномных фингерпринтов впервые удалось проследить за судьбой интродуцированных микроорганизмов-деструкторов нефти в открытой окружающей среде и показать их выживаемость и конкурентоспособность.

Исследована структура очищенных препаратов биосурфактантов, продуцируемых бактериями родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*. Установлено, что выделенные вещества имеют гликолипидную природу. Впервые для бактерий видов *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas fluorescens* продемонстрировано образование биоПАВ, идентичных рамнолипиду типа В. Показано, что родококки, выращенные на гексадекане, образуют несколько экзоклеточных биосурфактантов, представляющих собой сукциноилтрегалопиды.

Показана возможность глубинного периодического культивирования микроорганизмов-нефтедеструкторов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* в смешанной культуре с высоким выходом биомассы (с численностью родококков  $3,8 \times 10^{10}$  КОЕ/г и псевдомонад –  $3,4 \times 10^{10}$  КОЕ/г в концентрированной суспензии).

На основании консорциума бактерий родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas* разработан и запатентован биопрепарат «МикроБак» для биоремедиации почв с содержанием нефти до 15% в присутствии до 5% соли при рН от 6 до 8 при пониженных и умеренных температурах (4–32°C). Штаммы псевдомонад, входящие в состав биопрепарата, содержат плазмиды биодеградации ПАУ.

Создана микробная ассоциация «ВиО» как основа биопрепарата для биоремедиации почвенных и водных экосистем, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, состоящая из штаммов-деструкторов родов *Rhodococcus*, а также *Pseudomonas* и *Acinetobacter*, содержащих катаболические плазмиды. Бактерии данного микробного консорциума способны к деградации углеводов нефти при концентрации до 30% в температурном диапазоне 4–42°C в присутствии до 5% соли и рН от 4 до 10.

Выявлены наиболее устойчивые к нефтезагрязнению растения: ячмень и газонная трава, которые были затем использованы для создания растительно-микробных ассоциаций.

### **Научно-практическая значимость работы**

На основании скрининга коллекции микроорганизмов лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН и коллекции бактерий ЗАО «Биоойл» были отобраны и охарактеризованы бактерии, которые вошли в состав биопрепарата «МикроБак» и микробной ассоциации «ВиО», способных эффективно деградировать углеводороды нефти в условиях умеренного и холодного климата.

Для разработки биопрепаратов были выработаны критерии отбора штаммов-нефтедеструкторов. Комбинация всех перечисленных ниже свойств, наиболее значимых для эффективной деградации углеводов нефти, не описана ни для одного из известных биопрепаратов:

- способность к деградации высоких концентраций нефти или нефтепродуктов (30%) в широком диапазоне температур (от 4 до 42°C);
- способность к деградации углеводов при различных значениях рН (4–10);
- галотолерантность (до 5% NaCl);
- наличие катаболических плазмид;
- продуцирование эффективных биоПАВ;
- способность к колонизации корней растений;
- совместимость микроорганизмов в составе ассоциации.

Установлено, что при осуществлении контактной сушки биомассы микроорганизмов клетки родококков значительно более устойчивы к повреждающему действию обезвоживания по сравнению с псевдомонадами. Показано, что консервирующее действие глутамата и бензоата натрия на клетки микроорганизмов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* обеспечивает повышение их выживаемости при хранении.

В условиях лабораторных экспериментов показана более высокая эффективность опытных образцов биопрепаратов «МикроБак» и «ВиО» при очистке почвенных и водных модельных систем от нефти и дизельного топлива в сравнении с коммерческими биопрепаратами ЗАО «Биоойл», одними из наиболее востребованных на рынке РФ.

Преимущество ассоциации «ВиО» также заключалось в ускорении утилизации нефтяных загрязнений. Эффективность опытного образца биопрепарата «ВиО» в полевых испытаниях по очистке грунта от нефти на территории Пограничного месторождения Ямало-Ненецкого автономного округа составила 80% с июня по август 2008 г., что превысило показатели, полученные при использовании биопрепаратов ЗАО «Биоойл» (60–70%).

ЗАО «Биоойл» и ООО «Газпромнефть-Ноябрьскнефтегаз» дали положительные заключения об эффективности деградации нефти ассоциацией «ВиО» в полевых испытаниях. Эффективность деградации нефтепродуктов и нефти микробным консорциумом «ВиО» продемонстрирована в лабораторных испытаниях ООО «Газпромнефть- Восток» и ООО «Сибнефть -Восток».

На биопрепарат «МикроБак» разработаны и зарегистрированы Технические условия, получены Сертификат соответствия и Экспертное Заключение о соответствии требованиям «Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)», утвержденным решением Комиссии таможенного союза № 299 от 28.05. 2010 г. гл. II, разд. 15. Таким образом, биопрепарат «Микробак» может применяться на территориях Российской Федерации, Республики Беларусь и Республики Казахстан.

Получены 5 патентов РФ на штамм микроорганизмов, ассоциацию микроорганизмов-нефтедеструкторов, биопрепарат для очистки от загрязнений нефтью, способ его получения и применения, а также на способ производства сухой формы биопрепарата и способ ее активации.

### **Апробация работы**

Основные положения диссертационной работы были доложены, обсуждены и опубликованы в материалах следующих симпозиумов и конференций: EERO Workshop “Enzymatic and Genetic Aspects of Environmental Biotechnology” (Пушино, Россия, 1995); NATO Advanced Study Institute “Bioavailability of organic xenobiotics in the environment. Practical consequences for bioremediation” (Йесеник, Чешская Республика, 1997); VIII International Congress on Pseudomonas “Pseudomonas 2001”, (Брюссель, Бельгия, 2001); 12<sup>th</sup> International Biodeterioration and Biodegradation Symposium (Biosorption and Bioremediation III) (Прага, Чешская Республика, 2002); 1<sup>st</sup> FEMS Congress of European Microbiologists (Любляна, Словения, 2003); International Symposium on Molecular Biology of Bacterial Plasmids and Other Mobile Genetic Elements “Plasmid Biology 2004” (Канони, Корфу, Греция, 2004); International Congress “Pseudomonas 2005” (Марсель, Франция, 2005); 13<sup>th</sup> International Biodeterioration and Biodegradation Symposium (Мадрид, Испания, 2005); International Conference on Alpine and Polar Microbiology (Инсбрук, Австрия, 2006);

International Conference on Environmental Biotechnology (Лейпциг, Германия, 2006); 4<sup>th</sup> Moscow International Congress “Biotechnology: State of the Art and Prospects of Development” (Москва, Россия, 2007); 30<sup>th</sup> Arctic & Marine Oil Spill Program Technical Seminar (АМОР, Эдмонтон, Канада, 2007); III-я Международная конференция «Микробное разнообразие: состояние, стратегия сохранения, биотехнологический потенциал» (Пермь, Россия, 2008); ISTC Workshop at the International Conference on Contamination Soil («ConSoil», Милан, Италия, 2008); XII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (Стамбул, Турция, 2008); 5<sup>th</sup> international conference “Science and Training for Biosafety” (Пушино, Россия, 2008); Международная школа-конференция, посвященная 40-летию создания ГосНИИгенетика (Москва — Пушино, Россия, 2008); 3<sup>rd</sup> Congress of European Microbiologists “Microbes and Man — Interdependence and Future Challenges” (Гётеборг, Швеция, 2009); ISTC Workshop at the International Conference on Contamination Soil (“ConSoil”, Зальцбург, Австрия, 2010); Байкальский микробиологический симпозиум «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах 2011» (Иркутск, 2011); 8<sup>th</sup> International Conference “Contaminants in Freezing Ground” (CFG8) (Обергургл/Тироль, Австрия, 2012).

### **Связь работы с крупными научными программами и грантами**

Результаты, представленные в данной работе, были получены в ходе выполнения исследований, проведенных в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (госконтракты № 2.1.1.612, № 2.1.1.7789, № 2.1.1.9290, № 02.740.11.0296, № 02.740.11.0040, № П1749); Российской федеральной научно-технической программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники» (госконтракты №43.073.1.1.2502 и № 14.515.11.0027); гранта Министерства образования и науки РФ (РИ-16/025); грантов РФФИ (03-04-49145-а, 04-04-57807-АФ2004\_а, 06-04-96318-р\_центр\_а, 08-04-90028-Бел\_а, 08-04-99019-р\_офи, 11-04-97562-р\_центр\_а); грантов МНТЦ (2366 и 3624); грантов АФГИР (RB2-2377-PU-02, RUB2-010001-PU-05, RB2-2029); проекта Пятой рамочной программы Европейского сообщества (IC15CT980138); проектов INTAS (99-1487 и 01-2383).

### **Личный вклад автора**

В диссертации изложены результаты исследований, выполненных автором лично либо при его непосредственном участии. Личный вклад автора в работы, выполненные в соавторстве и включенные в диссертацию, состоит в формулировании проблемы, постановке целей и задач проведенных исследований, планировании экспериментов, руководстве их выполнением, получении экспериментальных данных, интерпретации, анализе и обобщении полученных результатов, подготовке научных публикаций по выполненной работе. Под руководством автора защищены семь магистерских и пять кандидатских диссертаций. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.



## Публикации

По материалам диссертации опубликовано 57 работ, в том числе 43 статьи, 2 обзора и 4 главы в научных книгах, получено 5 патентов РФ на изобретение.

## Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы», «Заключение», «Список литературы» и «Приложения». Работа изложена на 407 страницах машинописного текста, включает 51 таблицу и 101 рисунок. Библиография насчитывает 575 наименований, из них 148 отечественных и 427 зарубежных работ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Бактериальные штаммы.** В работе использовали 200 штаммов микроорганизмов из коллекции лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН им. Г.К. Скрыбина и 10 бактериальных штаммов из коллекции ЗАО «Биоойл», выделенных из территорий, загрязненных нефтью и нефтепродуктами.

**Питательные среды.** В качестве полноценных сред для культивирования микроорганизмов использовали среды Лурия-Бертани (Carhart, Hegeman, 1975) и Кинга Б (King et al., 1954), Pseudomonas Isolation Agar P (“Difco”, США) в качестве синтетической минеральной — среду Эванса (Evans, 1970) с дополнительным внесением источника углерода и энергии. Для культивирования псевдомонад и родококков в ферментере использовали полусинтетическую питательную среду на основе гидролизата казеина и дрожжевого автолизата (Петриков и др., 2008).

**Определение фракционного состава остаточной нефти** проводили методом адсорбционной хроматографии на сорбенте силикагель L 40/100 (“Chemapol”, Чехия). Элюирование углеводородов осуществляли последовательно гексаном, бензолом и смесью бензол-этанол (1:1 об./об.). Полученные «гексановые», «бензольные» и «спиртобензольные» фракции упаривали на воздухе и досушивали в вентилируемом сушильном шкафу при 75°C до постоянного веса. Содержание фракций рассчитывали в пересчете на исходную навеску пробы. Потери исходного образца за счет необратимой в данных условиях сорбции на силикагеле условно принимали за асфальтены и высокомолекулярные смолистые вещества.

**Общую убыль нефти** в жидкой среде определяли гравиметрическим методом (Другов, Родин, 2007).

**Определение общего содержания углеводородов нефти** осуществляли методом инфракрасной спектроскопии. Подготовку и анализ почвенных и водных образцов проводили в соответствии с методическими указаниями «Определение концентрации нефти в почве методом инфракрасной спектрофотометрии» (МУК 4.1.1956-05) и «Массовая концентрация нефтепродуктов в водах. Методика выполнения измерений ИК-фотометрическим методом» (ГОСТ Р 8.563-96).

**Плазмидную ДНК** выделяли методом щелочного лизиса (Birnboim, Doly, 1978).

**Электрофорез** проводили в горизонтальном агарозном геле по стандартной методике (Sambrook et al., 1989).

**Элиминацию плазмид** осуществляли путем длительного культивирования исследуемых штаммов в богатой среде ЛБ. Колонии элиминантов отбирали по отсутствию роста на среде Эванса с добавлением в качестве источников углерода и энергии нафталина или гексадекана, затем проверяли на наличие плазмид.

**Конъюгационный перенос плазмид** осуществляли, используя метод Данна и Гонзалеса (Dunn, Gunsalus, 1973).

**Полимеразную цепную реакцию (ПЦР)** проводили в амплификаторе GeneAmp PCR System 2400 (“Perkin-Elmer”, США) при стандартных условиях. Для амплификации гена 16S рРНК использовали праймеры 63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') и 1387r (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3') (Marchesi et al., 1998). Для амплификации гена большой субъединицы нафталиндиоксигеназы (*nahAc*) использовали праймеры Ac149f (5'-CCC YGG CGA CTA TGT-3') и Ac1014r (5'-CTC RGG CAT GTC TTT TTC-3') (Ferrero et al., 2002).

**Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции** *Hae*III, *Msp*II, *Eco*RI, *Pst*I, *Rsa*I проводили по протоколу фирмы — производителя буферных растворов и эндонуклеаз (“Fermentas”, Литва) при 37°C в течение 1 часа.

**Рестрикционный анализ** амплифицированной рибосомальной ДНК (ARDRA). Для идентификации аборигенных штаммов-деструкторов нафталина продукт амплификации гена 16S рРНК был гидролизован с использованием эндонуклеаз рестрикции *Hae*III, *Msp*II и *Rsa*I. Полученные путем электрофореза рестрикционные профили сравнивали с ранее полученными картинками рестрикции для различных видов псевдомонад (*P. putida*, *P. fluorescens*).

**Определение содержания нафталина** в почвенных образцах. Нафталин экстрагировали метанолом из почвы, затем количественный анализ осуществляли методом ВЭЖХ на колонке Pharmacia LKB Biotechnology Column (носитель Spherisorb ODS2, 5 мкм, 4 × 250 мм), элюент — 75% метанол.

**Эмульгирующую активность** определяли визуально согласно методике (Francy et al., 1991) по четырёхбалльной шкале и по изменению оптической плотности супернатанта культуры согласно методике (Cirigliano et al., 1984).

**Индекс эмульгирования** определяли по методике, описанной в (Cooper, Goldenberg, 1987), и рассчитывали как отношение объёма эмульсии, образуемой при перемешивании изучаемого раствора с гексадеканом, к общему объёму рабочего раствора.

**Измерение поверхностного натяжения** проводили на тензиометре Surface Tensiomat (“Cole-Parmer”, США) при температуре 25°C.

**Содержание гликолипидов** в бесклеточном супернатанте определяли фотоколориметрически фенол-серноокислым методом (Neto et al., 2007).

**Для выделения и очистки гликолипидных биоПАВ** их экстрагировали смесью хлороформ:метанол (3:1 об./об.) из бесклеточного супернатанта. Органическую фракцию

собирали и упаривали. Полученный экстракт очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле L40/100, элюирование образцов осуществляли смесями хлороформ:метанол различного состава.

**Тонкослойную хроматографию гликолипидов** проводили на пластинках Silicagel 60 (“Merck”, ФРГ) в системах хлороформ:метанол:вода в различных соотношениях. Для обнаружения гликолипидов пластинки обрабатывали  $\alpha$ -нафтольным реагентом, затем 10% серной кислотой и нагревали при 110°C (Кирхнер Ю., 1981). Гликолипиды проявлялись сине-фиолетовыми пятнами.

**Масс-спектрометрический анализ** выделенных гликолипидных биосурфактантов проводили на масс-спектрометре с ионной ловушкой LCQ Deca XP (“ThermoFinnigan”, США).

**Регистрацию инфракрасных спектров** биосурфактантов проводили на инфракрасном Фурье-спектрометре ФСМ1201 (ООО «Инфраспек», г. Санкт-Петербург).

**Изучение динамики роста микроорганизмов** и наработку биомассы осуществляли путём глубинного периодического культивирования в ферментёре АНКУМ-2М (г. Пущино) объёмом 10 л на среде, содержащей дрожжевой автолизат, кислотный гидролизат казеина (КГКДА), набор минеральных солей, глюкозу, салицилат натрия или дизельное топливо.

**Биомассу микроорганизмов в жидкой форме хранили** при 2–4°C с добавлением различных консервирующих растворов (1:1 по массе). Перед лиофилизацией и контактной сушкой биомассу смешивали с защитными средами различного состава (1:1 по массе). Лиофилизацию проводили на установке для лиофильной сушки КС30 (“Frigeria”, Чехия). Контактную сушку проводили при температуре 37°C с сорбентом (перлитовый песок).

**Лабораторный почвенный эксперимент с опытным образцом биопрепарата «МикроБак».** Для приготовления модельных почвенных систем использовали лугово-аллювиальную почву, взятую у р. Ока вблизи г. Пущино Московской области. Нефть вносили до уровня 2% (масс.). Загрязнённую почву инокулировали бактериями, выращенными в жидкой среде ЛБ до конца экспоненциальной фазы роста. Количество вносимой бактериальной суспензии рассчитывали так, чтобы конечная концентрация составляла  $5 \times 10^6$  КОЕ/г почвы. Минеральное удобрение «Нитроаммофоска» (ООО «Фаско+», Россия, N:P:K=1:1:1) вносили в количестве 1.5 г/кг почвы. Через две недели осуществляли повторную инокуляцию. Модельные почвенные системы инкубировали при комнатной температуре (22–24°C).

**Модельный полевой эксперимент с опытным образцом биопрепарата «МикроБак».** Эксперимент проводили на территории очистных сооружений г. Пущино. Размер опытных участков составлял 1 м × 1 м. Нефть вносили в количестве 3 л на участок. Бактериальную суспензию и удобрение вносили, как описано в пункте «Лабораторный почвенный эксперимент». Для установления степени восстановления почвы использовали овёс в качестве биоиндикатора.

**Условия полевых испытаний биопрепаратов.** Полевые испытания опытного образца биопрепарата «МикроБак» проводили на территории ОАО «Тульская Топливно-Энергетическая Компания» с сентября по ноябрь 2007 года. Бактериальную суспензию и удобрение вносили, как описано в пункте «Лабораторный почвенный эксперимент». Уровень начального загрязнения грунта составлял до 14 г нефтепродуктов на 1 кг грунта. Повторную инокуляцию биопрепаратом осуществляли через две недели.

Полевые испытания ассоциации «ВиО» проводили на территории Ямало-Ненецкого автономного округа, на участках Пограничного нефтяного месторождения с июня по август 2008 г. Ассоциацию вносили до конечной концентрации  $10^5$  КОЕ/г грунта, одновременно вносили минеральное удобрение мочевины (150 кг/га). Уровень начального загрязнения грунта нефтью составлял до 110 г нефти на кг почвы. Площадь загрязненного участка составляла 0.8 га. Повторную инокуляцию ассоциацией осуществляли через две недели. Для определения степени восстановления физико-химических характеристик почвы, ранее загрязненной сырой нефтью в результате естественных разливов, использовали смесь ячменя и многолетних трав как биоиндикатор.

**Мониторинг штаммов** в почве осуществляли по культурально-морфологическим признакам, маркерам антибиотикорезистентности и флюоресценции. Для штаммов родококков применяли RAPD-анализ с использованием четырех праймеров: OA20 (GTTGCGATCC), OG06 (GTGCCTAACC), OS09 (TCCTGGTCCC) и OS14 (AAAGGGGTCC).

**Для изучения влияния штаммов-деструкторов на рост растений** использовалась гнотобиотическая система (Simons et al., 1996). Выращивание растений проводили в закрытых пластиковых сосудах размером 77 мм × 77 мм × 97 мм (Magenta vessel, “Sigma”) в 150 г песка при влажности 15%. Нефть вносили до конечной концентрации 200 мкг/г песка. Для обеспечения растений минеральным питанием использовали среду “Murashige and skoog basal salt” (“Sigma”). Растения выращивали в следующих условиях: 12-часовой световой период и 12-часовой темновой период, при температуре 20°C.

**Статистическую обработку** результатов осуществляли с помощью встроенного статпакета Microsoft Office Excel 2007 (“Microsoft Corporation”, США).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **1 Изучение и характеристика активных микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти**

В процессе работы были изучены более двухсот штаммов – деструкторов углеводородов из коллекции лаборатории биологии плазмид ИБФМ им. Г. К. Скрыбина РАН и десять штаммов из коллекции ЗАО «Биоойл» на способность утилизировать дизельное топливо и нефть в качестве единственного источника углерода и энергии в широком температурном диапазоне (4–42°C).

### 1.1 Выбор и характеристика активных микроорганизмов, способных разлагать углеводороды нефти при пониженных температурах в присутствии соли

Наиболее активные штаммы-деструкторы выбирали по следующим критериям: способность к росту на дизельном топливе и/или нефти в жидкой минеральной среде как при температурах 24–32°C, так и при низких положительных температурах (4–6°C), в присутствии 3–10% NaCl. На основании полученных результатов были отобраны девять микроорганизмов – деструкторов углеводородов нефти: *Rhodococcus* sp. S25, *Rhodococcus* sp. S26, *Rhodococcus* sp. S67, *Rhodococcus* sp. X5, *Rhodococcus* sp. X25, *Rhodococcus* sp. Ars38, *Microbacterium* sp. Ars25, *Pseudomonas fluorescens* 142NF(pNF142), *Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142). Микроорганизмы-деструкторы различались по способности к росту на нефти, дизельном топливе, мазуте, бензоате, гексадекане, бензоле, толуоле, нафталине в качестве единственного источника углерода и энергии при температурах от 4 до 32°C. Все штаммы были способны к росту в жидкой минеральной среде с нефтью в присутствии 3% NaCl, два из них при 5% и только *Rhodococcus* sp. X5 – при 10%. Все микроорганизмы росли в температурном диапазоне от 4 до 32°C.

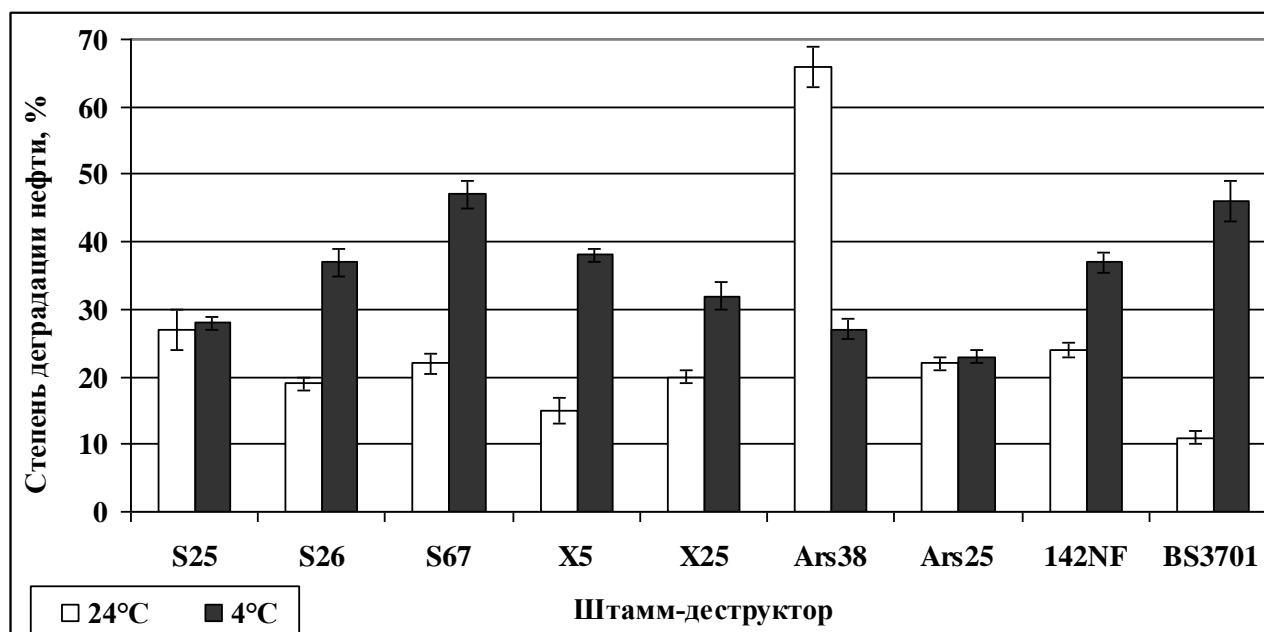


Рис. 1 Дегградация нефти отобранными штаммами микроорганизмов при 24°C и при 4°C в течение 20 дней за вычетом абиотической убыли.

В жидкой минеральной среде индивидуальные штаммы способны разлагать от 15% до 26% нефти при 24°C в течение 7–10 суток и от 28% до 47% при 4°C в течение 10–20 суток. У восьми из девяти отобранных микроорганизмов степень деструкции нефти при 4°C оказалась выше, чем при 24°C (рис. 1). В настоящее время известно лишь несколько работ, посвященных выделению и изучению микроорганизмов-деструкторов углеводородов, способных к эффективной дегградации нефти и нефтепродуктов при пониженной температуре. Ранее (Белоусова и др., 2002) было показано, что степень разложения нефти отдельными штаммами микроорганизмов при температуре 4°C может быть выше, чем при 24°C.

Поскольку почвы в Западной Сибири, где находятся основные разрабатываемые месторождения нефти, как правило, кислые (pH 4 – 6), часто с повышенным содержанием

соли (до 5%), и высокими уровнями загрязнения нефтью (10–30%), а температура даже в летний период колеблется в широких пределах (4–35°C), особое внимание было уделено выбору и характеристике штаммов, окисляющих углеводороды нефти в таких условиях.

## 1.2 Выбор и характеристика микроорганизмов-нефтедеструкторов по способности к деградации высоких концентраций нефти, при повышенных концентрациях морской соли и в широком температурном и рН-диапазонах

Наиболее активные штаммы-нефтедеструкторы (семь штаммов бактерий из коллекции лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН и десять – из коллекции ЗАО «Биоойл») проверяли на способность к деградации высоких концентраций нефти (до 30%) при повышенных концентрациях морской соли (до 10%) в широком температурном (4–42°C) и рН (4–10) диапазонах в жидкой минеральной среде.

Все исследованные штаммы (Табл. 1) были способны к росту на дизельном топливе (ДТ) (2%) в присутствии 5% соли, штаммы 142NF и 2В — в присутствии 7%, и только штамм Х5 — при 10%. Микроорганизмы S25, S26 и F701 способны деградировать ДТ (2%) в диапазоне рН 5–8, а бактерии 1В, 2А, 6 и 7 — в диапазоне рН 4–10. Штаммы 1В, 6, 7, S25, S26, F701 показали способность к деградации ДТ (2%) в температурном диапазоне 4–42°C. Интенсивный рост при концентрации нефти 40% при 24°C отмечен у штаммов S25, S26, 1В, 6 и F701, а при 4°C — только у микроорганизма S26. В присутствии 3% соли и ДТ в концентрации 40% рост наблюдался у штаммов F701, 1В, S26, 2С и 6 при 24°C, и у штаммов 1В и S26 — при 4°C. Наиболее высокая эмульгирующая активность отмечена у штаммов F701, S67, Х5, S26, 7 и 1В.

Табл. 1 Критерии первичного отбора микроорганизмов-деструкторов — способность к деградации углеводородов в следующих условиях:

Критерии отбора	Отобранные штаммы
рН среды 4–10	1В, 2А, 6, 7
7% NaCl	2В, Х5, 142NF
температура 4–42°C	1В, 6, 7, S25, S26, F701
концентрация нефти 40% при 24°C	1В, 6, S25, S26, F701
концентрация нефти 30% при 4°C	6, 7, S26
концентрация дизельного топлива 40%, соли 3% при 24°C	1В, 2С, 6, S26, F701
концентрация дизельного топлива 30%, соли 3% при 4°C	1В, 6, 7, S26, F701

Таким образом, микроорганизмы 6, 7, 1В, F701, S25, S26 минерализовали нефть и нефтепродукты в высокой концентрации (до 30%) в присутствии 3% морской соли в диапазоне температур 4 – 42°C, рН 4 – 10. Это предполагает их использование в условиях засоленности (например, на территории нефтеразлива, где, кроме нефти, присутствуют минерализованные пластовые воды). В связи с тем, что нередко встречаются кислые почвы, требующие очистки от нефтяных загрязнений (Gemell, Knowlas, 2000), что также характерно для месторождений нефти в Западной Сибири, выявленная у исследуемых штаммов способность к деградации углеводородов нефти в кислой среде может использоваться для биоремедиации нефтязагрязненных объектов с повышенной кислотностью.

После определения основных физиолого-морфологических характеристик штаммов наиболее активные микроорганизмы-нефтедеструкторы идентифицировали и на основании определения нуклеотидной последовательности 16S рДНК были определены как *Acinetobacter baumannii* (1В и 7), *Serratia* sp. (6).

В результате скрининга 17 наиболее активных штаммов-нефтедеструкторов обнаружены плазмиды у девяти: *Acinetobacter baumannii* 1В, *Acinetobacter baumannii* 7, *Pseudomonas putida* F701, *Pseudomonas* sp. 142NF, *Rhodococcus erythropolis* S26, *Rhodococcus* sp. X25, *Rhodococcus* sp. S25, *Serratia* sp. 6, штамма 4 (Рис. 2).

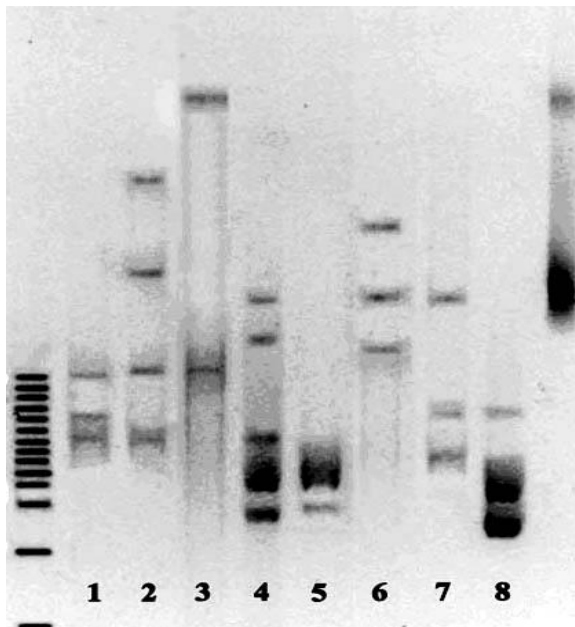


Рис. 2 Электрофореграмма плазмидных ДНК штаммов-деструкторов.

Маркер 2,5 kb + (Biorad, США); 1 — *Rhodococcus* sp. X25 (35, 21, 17 т.п.н.); 2 — *Rhodococcus* sp. S25 (77, 55, 36, 20 т.п.н.); 3 — *Pseudomonas putida* F701 (96, 36 т.п.н.); 4 — *Acinetobacter baumannii* 7 (50, 42, 20, 12, 6 т.п.н.); 5 — *Serratia* sp. 6 (14, 7 т.п.н.); 6 — *Acinetobacter baumannii* 1В (67, 48, 34 т.п.н.); 7 — *Rhodococcus erythropolis* S26 (48, 30, 15 т.п.н.); 8 — штамм 4 (30, 8, 6 т.п.н.); маркер  $\lambda$  48,5 kb

В экспериментах по конъюгационному переносу и элиминации плазмид было показано, что штаммы *Pseudomonas* sp. 142NF и *Pseudomonas putida* F701 несут конъюгативные плазмиды биodeградации нафталина и, таким образом, способны увеличивать катаболический потенциал почвенных микробных популяций путем распространения генов. Вопрос о способности к переносу у плазмид биodeградации гексадекана микроорганизмов *Acinetobacter baumannii* 7, *Acinetobacter baumannii* 1В, *Rhodococcus erythropolis* S26, *Rhodococcus* sp. S25, *Serratia* sp. 6, штамма 4 остается открытым, однако эти штаммы также могут участвовать в распространении катаболических генов, например, путем мобилизации и трансформации плазмидной ДНК. Клетка-хозяин погибает, лизируется и ДНК с катаболическими генами попадает во внешнюю среду и может в ней сохраняться некоторое время, а при контакте с подходящим новым бактериальным хозяином путем трансформации ДНК может встраиваться в генетическую систему микробной клетки (Прозоров, 1999). Таким образом, использование в составе биопрепарата микроорганизмов, содержащих

конъюгативные или неконъюгативные плазмиды биодegradации, представляется обещающим подходом в процессе разработки новых технологий биоремедиации.

## 2 Влияние катаболических плазмид на биодegradацию углеводородов нефти

Известно множество примеров участия плазмидных генов в дegradации углеводородов, включая короткоцепочечные алканы, замещенные и незамещенные ароматические углеводородов и другие ксенобиотики (Sayler, 1990; Wallace et al., 1992; Narayana et al., 1990; Top et al., 2002). Ароматические соединения обычно составляют 10–30 % углеводородов нефти, они являются самыми опасными – токсичными и устойчивыми компонентами нефти и нефтепродуктов. Для выявления роли плазмид биодegradации нафталина в микробной деструкции углеводородов нефти изучали утилизацию нефти плазмидосодержащими штаммами-деструкторами рода *Pseudomonas* по сравнению с их бесплазмидными вариантами.

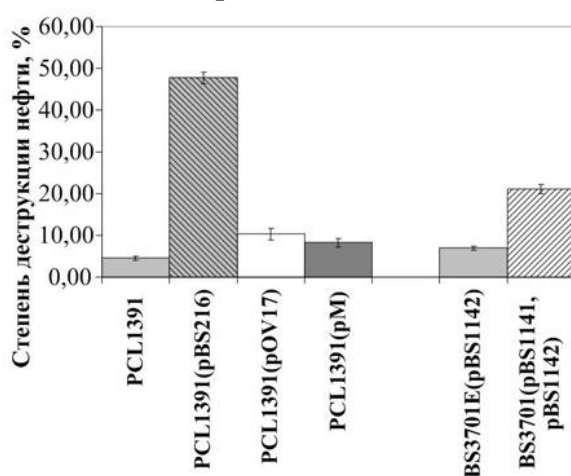


Рис. 3 Степень деструкции нефти природными плазмидосодержащими штаммами и их бесплазмидными вариантами за 7 суток роста в жидкой минеральной среде при 24°C за вычетом абиотической убыли нефти

(pM – плазмида биодegradации нафталина pNF142::TnMod-OTc)

Деструкцию нефти штаммами оценивали по суммарному показателю её убыли в жидкой минеральной среде, определяемому весовым методом (гравиметрия). Показано, что наличие плазмиды биодegradации нафталина pBS216 в штамме *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 приводило к существенному увеличению (в десять раз) деструкции нефти по сравнению с бесплазмидным микроорганизмом. Наличие плазмид биодegradации нафталина pNF142::TnMod-OTc и pOV17 в данном штамме не вело к такому значительному эффекту (Рис.3), что подчеркивает важность такого аспекта катаболического потенциала микроорганизмов, как комбинация «бактериальный хозяин - плазмида».

Гены, кодирующие катехол-2,3-диоксигеназу, часто имеют плазмидную локализацию (Boronin and Kosheleva, 2014). Показано, что плазмиды pOV17 и pBS216 аналогичны по структуре, но значительно отличаются по уровню активности катехол-2,3-диоксигеназы (Anokhina et al., 2006), что может иметь эффект при дegradации нефти одним и тем же бактериальным хозяином, содержащим разные плазмиды. Присутствие в штамме *P. putida* BS3701 плазмиды биодegradации нафталина pBS1141 также



приводило к увеличению (в три раза) убыли углеводов нефти по сравнению со штаммом BS3701E, не содержащим данную плазмиду (Рис.3) .

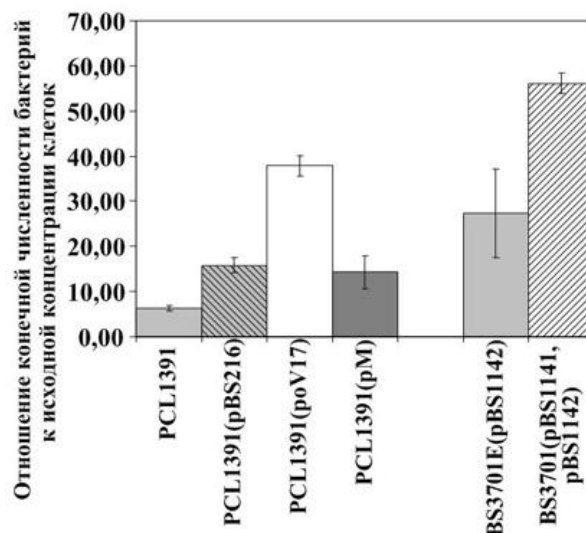


Рис. 4 Отношение численности микроорганизмов к исходной концентрации клеток через семь суток роста в жидкой минеральной среде с нефтью при 24°C

Как видно из полученных данных (Рис. 4), при росте на нефти по сравнению с бесплазмидными микроорганизмами плазмидосодержащие бактерии показали больший прирост биомассы клеток. Наличие генов биodeградации расширяет спектр утилизируемых бактерией-хозяином субстратов. Например, нафталиндиоксигеназа, кодируемая генами плазмид биodeградации нафталина, катализирует порядка 76-и реакций, (реакции дегидратации, монооксигенирования, диоксигенирования, сульфюокисления, O- и N- деалкилирования). Полученные нами результаты свидетельствуют, что комбинация «бактериальный хозяин - плазида» также важна в процессе микробной деструкции углеводов нефти.

Наличие плазмид в штаммах обусловило и изменение фракционного состава остаточной нефти. Обнаружено увеличение степени деструкции бензольной, бензольно-спиртовой и гексановой фракций по сравнению с результатами, полученными при культивировании бесплазмидных штаммов. Наибольшая деструкция моно- и полиароматических, парафинонафтоновых углеводов, смол и асфальтенов показана для штамма *P. chlororaphis* PCL1391(pBS216), где степень деструкции трех основных фракций нефти составила 31%, 26% и 38%, соответственно, что обусловило наивысший показатель степени деструкции нефти (48%) в данном эксперименте.

Изучение биodeградации нефти плазмидосодержащими штаммами-деструкторами в сравнении с бесплазмидными бактериями проводили также в модельных почвенных системах в течение восьми недель. Наличие плазмидных генов биodeградации ароматических соединений обеспечивало преимущество в приросте биомассы плазмидосодержащих штаммов в сравнении с их бесплазмидными вариантами, а степень разложения нефти при внесении плазмидосодержащих микроорганизмов увеличивалась в два–три раза по сравнению с интродукцией бесплазмидных аналогов (рис. 5).

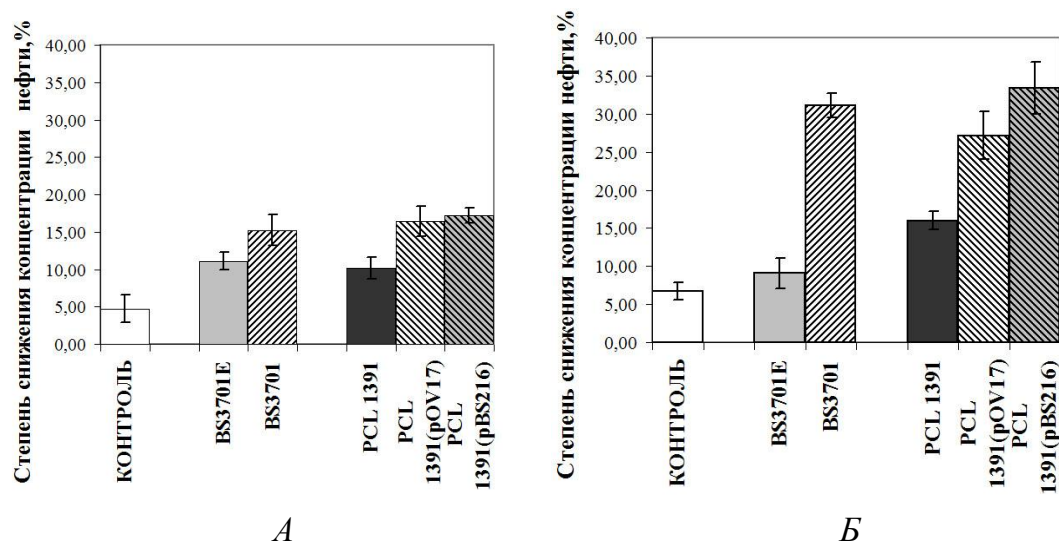


Рис. 5 Степень деструкции нефти в стерильной (А) и нестерильной (Б) почве через восемь недель за вычетом абиотической убыли

Однако степень деструкции нефти интродуцированными несущими плазмиды микроорганизмами в нестерильной почве была выше по сравнению со стерильной почвой, инокулированной теми же бактериями (рис. 5Б), что можно объяснить присутствием и деятельностью аборигенных микроорганизмов в почве, возможным горизонтальным переносом плазмид между интродуцированными микроорганизмами и аборигенными бактериями. Таким образом, представляется целесообразным применение микроорганизмов-деструкторов, содержащих плазмиды биодegradации, в составе биопрепаратов для очистки почв и вод от нефти.

### 3 Роль горизонтального переноса катаболических плазмид в процессе биодegradации ПАУ

#### 3.1 Изучение горизонтального переноса плазмид биодegradации ПАУ в модельных почвенных системах

Для исследования процесса горизонтального переноса плазмид в процессе биодegradации ПАУ были сконструированы штаммы-деструкторы *P. putida* KT2442 (pNF142::TnMod-OTc) и *P. putida* BS394 (pNF142::TnMod-OTc).

С использованием транспозонного мутагенеза плазмиды pNF142, содержащаяся в природном штамме-деструкторе нафталина *Pseudomonas fluorescens* 142NF, была помечена геном резистентности к тетрациклину, затем с помощью конъюгационного переноса перенесена в штамм *P. putida* KT2442, имеющего в составе хромосомы ген зеленого флюоресцирующего белка gfr и ген устойчивости к канамицину. Полученный штамм *P. putida* KT2442(pNF142::TnMod-OTc) легко идентифицировался путем посева на агаризованную среду Лурия-Бертани: колонии давали характерное зеленое свечение в УФ-свете (254 нм), обусловленное флюоресцирующим белком. Затем плазмиду pNF142::TnMod-OTc из штамма *P. putida* KT2442(pNF142::TnMod-OTc) перенесли путем конъюгации в ауксотрофный штамм *P. putida* BS394 Cys<sup>-</sup>Str<sup>r</sup>, после чего он получил резистентность к тетрациклину и способность к росту на нафталине. Встройка мини-транспозона TnMod-OTc не повлияла на экспрессию генов катаболизма нафталина

на плазмиде pNF142 и ростовые параметры ( $\mu_{\max}$  на нафталине) сконструированных штаммов.

Эффект интродукции деструкторов органических соединений в почву и активный ил, а также влияние распространения катаболических плазмид среди аборигенных микроорганизмов на процессы биodeградации начали изучать больше двадцати лет назад (Brokamp, Schmidt, 1991; DiGiovanni et al., 1996; Top et al., 2000). Однако работы, в которых одновременно изучали бы биodeградацию ПАУ и перенос дегративных плазмид в процессе биodeградации, в литературе отсутствуют.

Исследование популяционной динамики штаммов-деструкторов, процесса горизонтального переноса катаболических плазмид и биodeградации нафталина проводили в следующих почвенных лабораторных микрокосмах, загрязнённых 2% нафталина:

микрокосм 1 — стерильная почва; микрокосм 2 — нестерильная почва;

микрокосм 3 — нестерильная почва + *P. putida* KT2442 (бесплазмидный);

микрокосм 4 — стерильная почва + *P. putida* KT2442 (бесплазмидный) + *P. putida* BS394(pNF142::TnMod-OTc);

микрокосм 5 — нестерильная почва + *P. putida* KT2442 (бесплазмидный) + *P. putida* BS394(pNF142::TnMod-OTc).

В процессе работы проводили мониторинг переноса как меченой плазмиды pNF142::TnMod-OTc из штамма BS394, так и аборигенных плазмид из аборигенных деструкторов нафталина в бесплазмидный штамм KT2442.

На первом этапе из нестерильной почвы, используемой в эксперименте, были выделены 5 штаммов аборигенных деструкторов нафталина, отнесённых к виду *Pseudomonas fluorescens* (штаммы AP1–AP3) и *Pseudomonas putida* (штаммы AP4 и AP5).

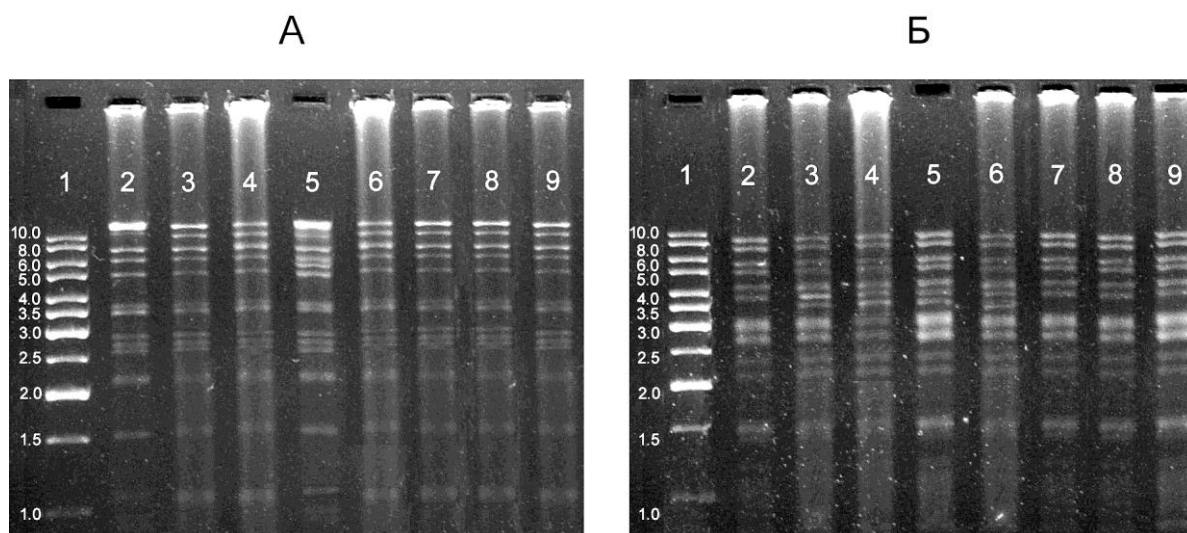


Рис. 6 Рестрикционные профили препаратов плазмидной ДНК, обработанных эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* (А) и *PstI* (Б): 1 — 1 kb Ladder Gene Ruler («Fermentas», Литва); 2 — pNF142; 3 — pAP35; 4 — pAP36; 5 — pAP4; 6 — pAP5; 7 — pNF142::TnMod-OTc (KT2442 клон 1); 8 — pNF142::TnMod-OTc (KT2442 клон 21); 9 — исходная pNF142::TnMod-OTc

С помощью ПЦР с праймерами Acl49f и Acl1014r (Ferrero et al., 2002) было показано наличие гена *nahAc*, кодирующего большую субъединицу нафталиндиоксигеназы, во всех пяти штаммах (данные не приведены). Было обнаружено, что штаммы AP4 и AP5 содержат плазмиды размером около 80 т.п.н. Анализ плазмидной ДНК, обработанной эндонуклеазами рестрикции, выявил сходство рестрикционных профилей аборигенных плазмид (Рис. 6). Причём, плазмиды pAP4 и pAP5 оказались подобны ранее описанной плазмиде биодеградации нафталина pDTG1 (Dennis & Zylstra, 2004). Данный факт подтверждает данные о широком распространении pDTG1-подобных плазмид в географически удаленных регионах (Stuart-Keil et al., 1998).

Ранее Смалла с соавт. (Smalla et al., 2000) осуществили экзогенную изоляцию R-плазмид путем скрещивания реципиента с аборигенными бактериями из суспензии, выделенной из навоза, на богатой агаризованной среде.

В нашей работе была проведена эндогенная изоляция природных катаболических плазмид, которая заключается в переносе аборигенных плазмид в интродуцированные бесплазмидные штаммы в почве с последующим отбором трансконъюгантов на селективных агаризованных средах. Были обнаружены следующие направления плазмидного переноса:

1) горизонтальный перенос меченой катаболической плазмиды pNF142::TnMod-OTc из интродуцированного в почву донорного штамма BS394 Cys<sup>-</sup> в бесплазмидный штамм KT2442;

2) конъюгационный перенос аборигенных плазмид в интродуцированный бесплазмидный штамм KT2442. На 14 сутки численность трансконъюгантов в почве составила 10<sup>3</sup> КОЕ/г сухой почвы (1% от общей численности деструкторов нафталина). Рестрикционные профили аборигенных плазмид были аналогичны профилю ранее описанной плазмиды биодеградации нафталина pDTG1 (Dennis, Zylstra, 2004).

Исследование динамики убыли нафталина в почве показано, что в микрокосмах 3, 4 и 5, где происходил горизонтальный перенос плазмид, степень деградации модельного поллютанта была выше (Рис. 7).

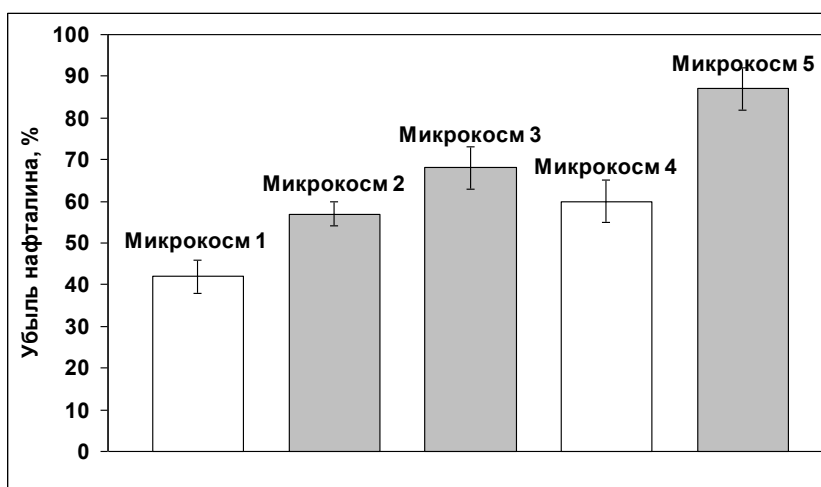


Рис. 7 Сравнение эффективности деградации нафталина в микрокосмах через 14 суток. Микрокосмы со стерильной почвой выделены белым, с нестерильной – серым

Таким образом, в лабораторных условиях показано, что в почве происходит перенос плазмид биодegradации нафталина, причем интродукция в почву штаммов-деструкторов ускоряет процесс деградации нафталина, а возникающие в почве трансконъюганты способствуют ускорению данного процесса.

### 3.2 Горизонтальный перенос плазмид биодegradации ПАУ в открытой почве

Работы, посвященные горизонтальному переносу плазмид биодegradации ПАУ в почве в условиях открытой окружающей среды, немногочисленны (Herrick et al., 1997; Stuart-Keil et al., 1998; Hohnstock et al., 2000; Wilson et al., 2003). Одновременного наблюдения за судьбой маркированного штамма-деструктора ПАУ и меченой плазмиды биодegradации в открытой почве другими исследователями не проводилось.

Изучение горизонтального переноса плазмид проводили на территории очистных сооружений г. Пущино.

Опытная площадка представляла собой шесть отделенных друг от друга участков площадью 1 м<sup>2</sup> каждый (Рис. 8).

<b>Участок 1</b> Контроль	<b>Участок 2</b> Контроль с нафталином
<b>Участок 3</b> КТ2442(pNF142::TnMod-OTc)	<b>Участок 4</b> КТ2442(pNF142::TnMod-OTc) нафталин
<b>Участок 5</b> КТ2442 и BS394(pNF142::TnMod-OTc)	<b>Участок 6</b> КТ2442 и BS394(pNF142::TnMod-OTc) нафталин

Рис. 8 Схема полевого эксперимента по изучению горизонтального переноса кatabолических плазмид

В процессе эксперимента следили за динамикой общей численности микроорганизмов и бактерий-деструкторов нафталина и динамикой убыли нафталина в открытой почве (Рис. 9). На всех трех загрязнённых участках (№2, №4, №6) убыль нафталина происходила с разной скоростью. Медленнее всего концентрация нафталина снижалась на контрольном участке (0.2 г/кг почвы на 30 сутки), быстрее — на четвертом (0.06 г/кг почвы), и максимально быстро — на шестом (0.01 г/кг почвы на 20 сутки).

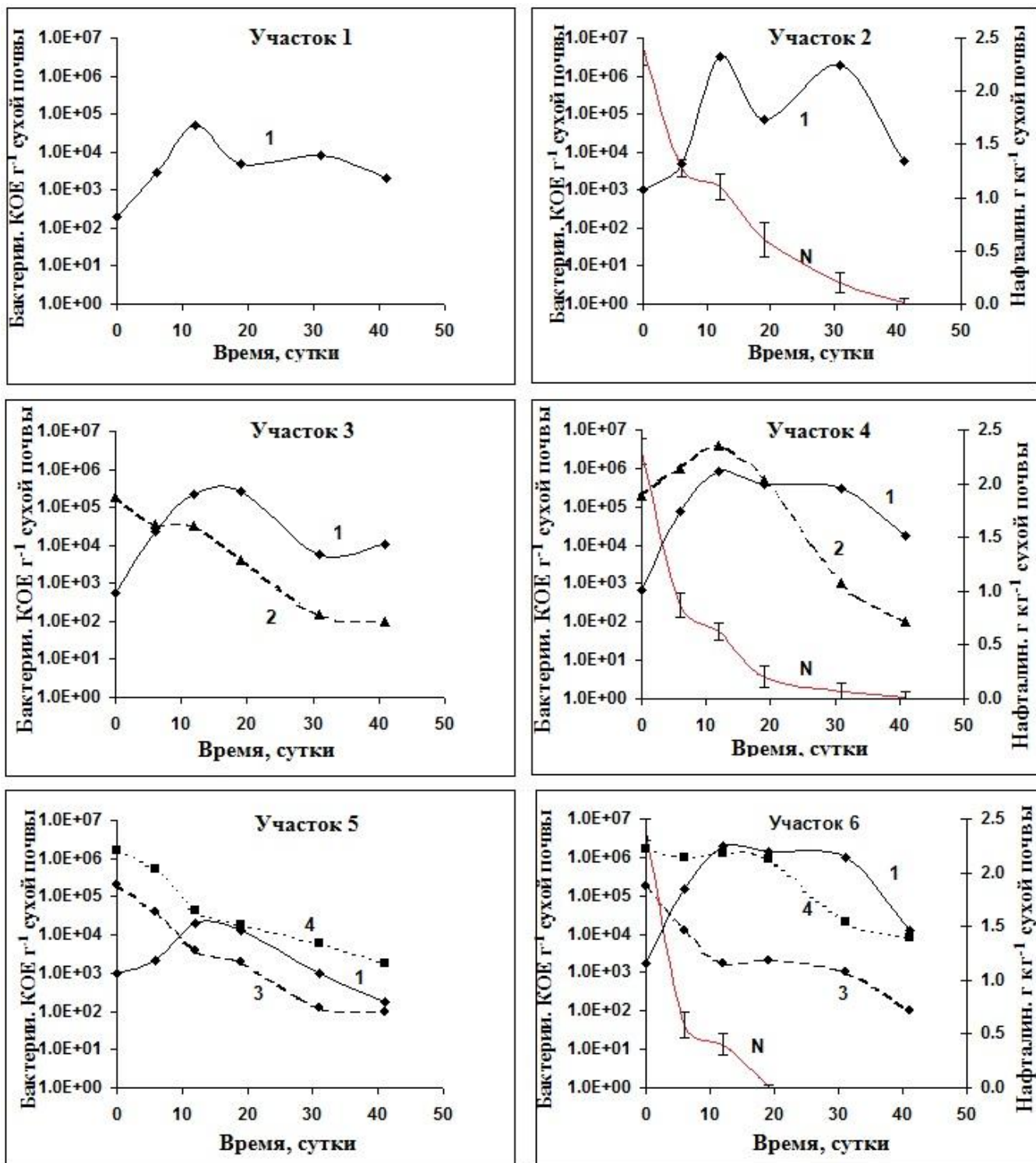


Рис. 9 Динамика численности микроорганизмов и содержания нафталина в почве

1 — численность аборигенных деструкторов нафталина;

2 — численность плазмидосодержащего штамма *P. putida* KT2442(pNF142::TnMod-OTc);

3 — численность бесплазмидного штамма *P. putida* KT2442;

4 — численность штамма *P. putida* BS394(pNF142::TnMod-OTc);

N — кривая убыли нафталина

Показано, что в почве с нафталином и без него (участки №№4–6) плазида pNF142::TnMod-OTc переносилась в аборигенные почвенные бактерии (флюоресцирующие и нефлюоресцирующие *Pseudomonas*, так же как в бесплазмидный

штамм KT2442. На участке №4 было выделено четыре трансконъюганта, на участке №5 – девять трансконъюгантов, наибольшее количество трансконъюгантов (21) было получено на участке №6, причем в последнем случае двадцать из них было представлено аборигенными бактериями, акцептировавшими меченую плазмиду. Аборигенные бактерии, содержащие плазмиду pNF142::TnMod-OTc, были определены путем частичного секвенирования генов 16S рРНК как сходные с *P. lini*, *P. frederiksbergensis*, *P. jessenii*, *P. graminis*, *P. putida* и *P. alcaligenes*. Рестрикционные профили плазмидной ДНК, выделенной из трансконъюгантов и гидролизованной эндонуклеазой *EcoRI*, были сходными с профилем плазмиды pNF142::TnMod-OTc (рис. 10). Ранее было показано наличие транспозонов в составе кatabолических плазмид – для плазмиды биodeградации толуола pWW0 (Greated et al., 2002) и плазмид биodeградации нафталина pDTG1 (Dennis, Zylstra, 2004), NAH7 (Tsuda, Iino, 1999), NPL-1 (Соколов и др., 2005). Из картин рестрикции препаратов плазмидной ДНК, выделенной из штаммов *P. frederiksbergensis* OSP3 и *Pseudomonas* sp. OSP10 видно появление дополнительных фрагментов по сравнению с исходной плазмидой pNF142::TnMod-OTc, обусловленное, по-видимому, внутриплазмидными перестройками вследствие присутствия в плазмиде транспозона.

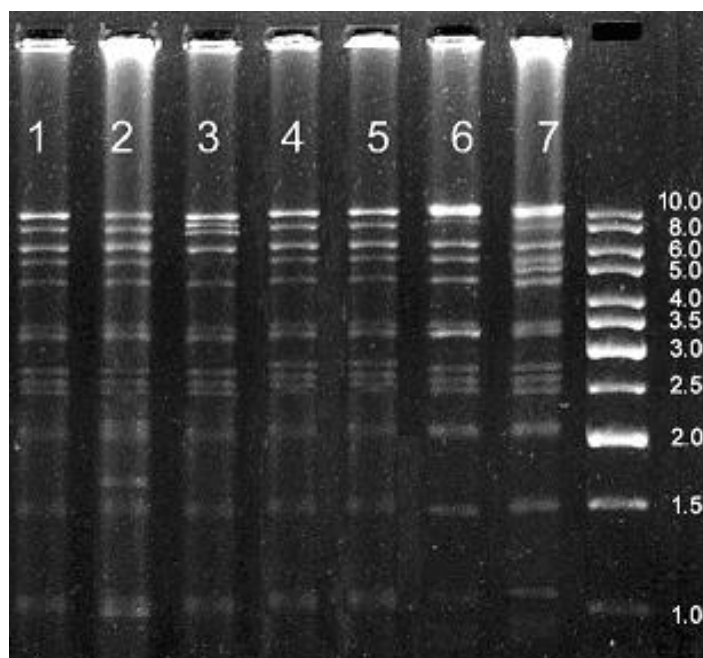


Рис. 10 Рестрикционные профили препаратов плазмиды pNF142::TnMod-OTc, выделенных из различных штаммов и обработанных эндонуклеазой рестрикции *EcoRI*:  
 1 — исходный штамм KT2442; 2–5 — аборигенные трансконъюганты (2 — *P. frederiksbergensis* OSP3, 3 — *Pseudomonas* sp. OSP10, 4 — *P. putida* OSP16, 5 — *P. putida* OSP19); 6–7 — трансконъюганты штамма KT2442 (6 — клон 25, 7 — клон 22);  
 8 — 1 kb Ladder Gene Ruler™

Из пяти возможных путей переноса было обнаружено три (Рис. 11). Частота переноса плазмид составила  $2 \times 10^{-6} - 4 \times 10^{-5}$  на клетку донора. Частота плазмидного переноса была выше на участке №6, содержащим нафталин в качестве селективного фактора. Ранее ряд авторов (Nüßlein et al., 1992; Top et al., 1998; De Liphay et al., 2001 и др.) показали, что селективное давление в почве может значительно влиять на



распространение генов. Интересно отметить, что перенос меченых плазмид происходил между BS394(pNF142::TnMod-OTc) и аборигенными бактериями (как флюоресцирующими, так и нефлюоресцирующими) на участке №6, содержащим нафталин, а так же и без селективного давления на участке №5 — между донором BS394(pNF142::TnMod-OTc) и бесплазмидным реципиентом KT2442.

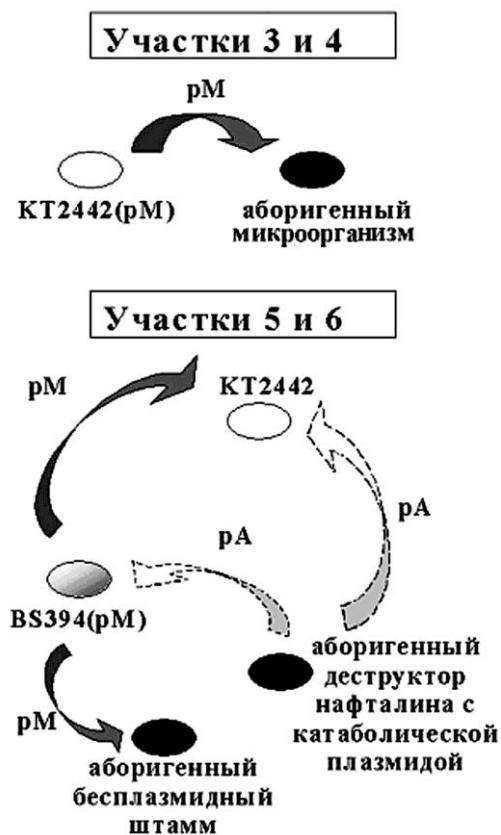


Рис. 11 Схема возможных направлений переноса плазмид биодegradации нафталина в открытой окружающей среде (стрелки со сплошной границей – перенос в эксперименте показан; стрелки с прерывистой границей – переноса не зафиксировано): pM – плазида pNF142::TnMod-OTc, pA – аборигенная плазида биодegradации нафталина

Суммарная активность аборигенных деструкторов и интродуцированных штаммов KT2442 и BS394, исходная численность которых на два-три порядка превышала таковую аборигенных штаммов, обеспечила ускоренную деструкцию нафталина на участках №4 и №6, соответственно. Наиболее быстрая убыль нафталина на участке №6 объясняется, по всей видимости, вкладом образующихся трансконьюгантов в процесс биодegradации.

В нашей работе показано, что маркированные плазмидосодержащие штаммы BS394(pNF142::TnMod-OTc) и *P. putida* KT2442(pNF142::TnMod-OTc) способны сосуществовать с аборигенными почвенными микроорганизмами и выживать в открытой почве. Полученные результаты подтверждают, что плазмиды дегradации нафталина способны к переносу внутри почвенных микробных популяций и поэтому могут увеличивать эффективность биодegradации углеводов в полевых условиях.

Таким образом, дегradативный потенциал почвенных микроорганизмов может быть увеличен не только за счет интродукции бактерий-деструкторов, но и за счет



процессов горизонтального переноса плазмид биодegradации из интродуцированных бактерий.

## **4 Образование биологических ПАВ бактериями-эффективными нефтедеструкторами**

### **4.1 Способность микроорганизмов к продуцированию биоПАВ**

Образование поверхностно-активных соединений является характерным свойством углеводородоокисляющих микроорганизмов. В процессе бактериального окисления таких водонерастворимых соединений, как алканы, циклоалканы, ПАУ, биоПАВ являются важнейшими участниками. Их роль заключается в повышение биодоступности субстратов, поэтому изучение строения, свойств и закономерностей образования этих соединений актуально (Van Hamme et al., 2003; Cameotra & Singh, 2009). В связи с этим, способность к продуцированию биосурфактантов является одним важных критериев при отборе наиболее перспективных нефтедеструкторов для составления биопрепаратов.

Для дальнейшего более детального изучения были выбраны штаммы, для которых была показана наиболее высокая эмульгирующая активность: *P. fluorescens* 142NF, *P. putrida* BS3701, *Rhodococcus* sp. S67, *Rhodococcus* sp. X5, *Rhodococcus* sp. S26, как перспективные продуценты биоПАВ (п. 1.2).

При изучении способности микроорганизмов к синтезу ПАВ использовали простые и экспрессные методы (Satpute et al., 2010): измерение поверхностного натяжение культуральной жидкости, определение индекса эмульгирования и эмульгирующей активности, определение содержания гликолипидов.

Общеизвестно, что источник углерода может существенно влиять на образование биоПАВ. Важную роль играет гидрофобность субстрата: рост на водорастворимых и гидрофобных субстратах может принципиально различаться (Muthusamy et al., 2008). Поэтому выращивание микроорганизмов проводили на двух часто используемых в исследованиях биоПАВ субстратах, относящимся к разным типам: гексадекан, как гидрофобный субстрат, и глюкоза, как гидрофильный.

Полученные данные показали, что гексадекан стимулирует значительно более интенсивное образование внеклеточных биоПАВ, чем глюкоза. В культуральной среде содержание биоПАВ составило 190–740 мг/л (для глюкозы — не более 50 мг/л). При росте на гексадекане происходило существенное снижение поверхностного натяжения (до 34–31 мН/м, в контроле 77 мН/м), отмечены наибольшие значения эмульгирующей активности у штамма *Rhodococcus* sp. S26 и индексов эмульгирования у штаммов *Rhodococcus* sp. X5 и *Rhodococcus* sp. S67. Анализируя эти характеристики, можно заключить, что родококки эффективней продуцируют биосурфактанты при росте на гидрофобном источнике углерода и энергии по сравнению с псевдомонадами.

После выращивания на глюкозе в бесклеточном супернатанте родококков наблюдали низкую оптическая плотность и отсутствие плотного эмульсионного слоя; в культуральной жидкости значения индексов эмульгирования были высокими, что, возможно, свидетельствует об образовании клетками родококков при росте на глюкозе

биоПАВ, связанных с клеточной стенкой (эндо-тип). Изучение эмульгирующих свойств целых клеток бактерий, выращенных на гидрофильных субстратах, показало, что суспензии клеток родококков способны эффективно стабилизировать эмульсии гексадекана с водой: индексы эмульгирования  $E_{24}$  составили 35–48%; для псевдомонад (*P. fluorescens* 142NF и *P. putida* BS3701) эмульгирование не наблюдали ( $E_{24} = 0$ ).

Таким образом, все исследованные микроорганизмы-нефтедеструкторы родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas* способны продуцировать биоПАВ. Самыми эффективными продуцентами биосурфактантов экзо-типа являются родококки при росте на гексадекане; при росте на глюкозе они образуют связанные с клетками биоПАВ (эндо-тип). Псевдомонады синтезируют только внеклеточные биосурфактанты и только при росте на гексадекане.

#### 4.2 Определение особенностей строения биосурфактантов

БиоПАВ очищали колоночной хроматографией после экстракции из бесклеточного супернатанта. Детекцию гликолипидных компонентов проводили методом тонкослойной хроматографии. Мажорными биосурфактантами, продуцируемыми бактериями родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas*, являются, соответственно, трегалолипиды и рамнолипиды (Desai & Banat, 1997). Наличие углеводной части в молекулах этих соединений позволяет использовать специфические реакции для их идентификации методом ТСХ. При обработке пластин  $\alpha$ -нафтолом в присутствии серной кислоты при нагревании, гликолипиды проявляются фиолетовыми пятнами. ТСХ биоПАВ, продуцируемых псевдомонадами, показала наличие единственного, сильно размытого пятна с величиной удерживания  $R_f$  0.32, что соответствует дирамнолипидам (Matsufuji et al., 1997; Zhang & Miller, 1994). У родококков было обнаружено пять (штаммы *Rhodococcus* sp. X5 и S26) или четыре (штамм *Rhodococcus* sp. S67) гликолипидных компонентов со значениями удерживания  $R_f$ : 0.32; 0.46; 0.51 (отсутствует у штамма S67); 0.57; 0.63.

Очищенные биоПАВ изучали с помощью масс-спектрометрии (электронное распыление в режиме положительной ионизации). Для гликолипидов микроорганизмов *P. putida* BS3701, *P. fluorescens* 142NF ряд сигналов наблюдали в диапазоне 700–900 Да (рис. 12а). Одним из самых интенсивных является пик, который соответствует псевдомолекулярному иону  $[M + H^+]$  массой 803 Да. Согласно (Abdel-Mawgoud et al., 2010) массой 802 Да обладает рамнолипид В, содержащий два остатка гидроксидекановой кислоты и один остаток деценовой кислоты (рис. 12а). Массы каждой пары соседних пиков различаются на 14 Да, что соответствует массе  $-CH_2-$  фрагмента. Для псевдомонад характерны рамнолипиды, содержащие гомологичные жирные кислоты. Из полученных данных можно предположить, что штаммы *P. putida* BS3701 и *P. fluorescens* 142NF продуцируют смесь рамнолипидов, гомологичных рамнолипиду типа В.

В масс-спектре биоПАВ *Rhodococcus* sp. X5 и *Rhodococcus* sp. S26 присутствуют одинаковые пики (Рис. 12б). В ряде исследований у родококков основные сигналы в масс-спектрах электронного спрея были представлены псевдомолекулярными ионами

[M+Na<sup>+</sup>] массой 871.5 и 899.6 Да, соответственно (Tuleva et al., 2008; Rapp & Gabriel-Jurgens, 2003). Установлено соответствие им гомологичных сукциноилтрегалолипидов: диоктаноил-деcanoила (848 Да) и октаноил-дидеcanoила (876 Да), различающихся на 28 Да, то есть на удвоенный (-CH<sub>2</sub>-)<sub>2</sub> метиленовый фрагмент (Рис. 12б). Сравнение данных фактов с полученными в нашей работе результатами позволяет сделать вывод, что штаммы *Rhodococcus* sp. X5 и *Rhodococcus* sp. S26 синтезируют трегалолипиды с аналогичным строением. Три сигнала не удалось сопоставить с конкретными структурами. Разница между двумя пиками 866.4 и 894.4 равна 24 Да, что может свидетельствовать о присутствии гомологичных соединений.

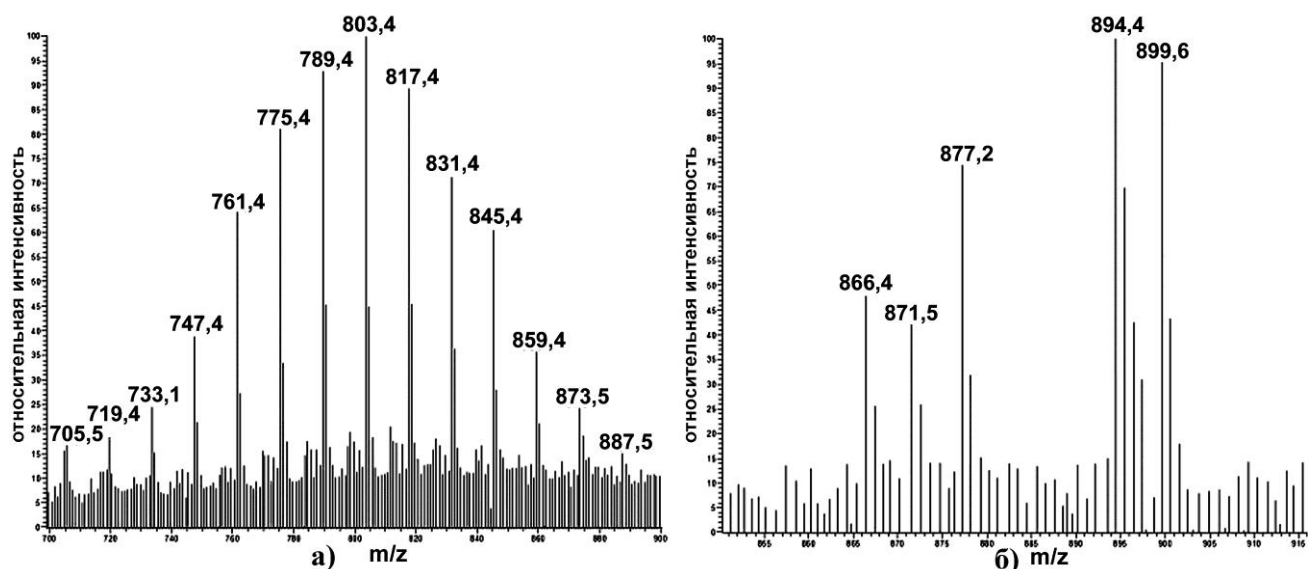


Рис. 12 Масс-спектры гликолипидных биоПАВ:

а) для штамма *P. fluorescens* 142NF;

б) для штамма *Rhodococcus* sp. X5

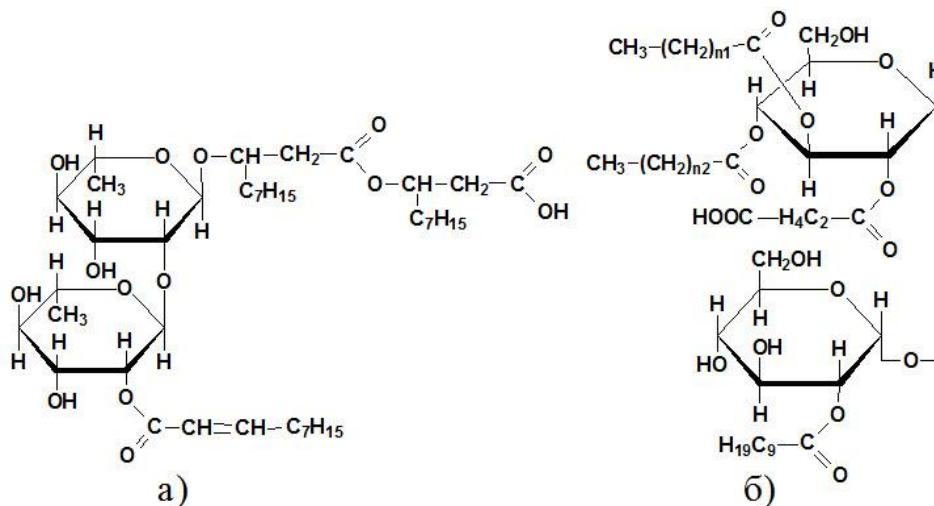


Рис. 13 Предполагаемая структура гликолипидных биоПАВ.

а) Рамнолипид В, продуцируемый бактериями рода *Pseudomonas* (Abdel-Mawgoud et al., 2010);

б) Сукциноил-трегалолипиды, продуцируемые бактериями рода *Rhodococcus* ( $n_1, n_2 = 6, 8$ ) (Tuleva et al., 2008; Rapp & Gabriel-Jurgens, 2003)

В биоПАВ псевдомонад и родококков методом ИК-спектроскопии нами показано наличие функциональных групп, свойственных для гликолипидов предполагаемой структуры (Рис. 13).

Таким образом, все исследованные в данном разделе микроорганизмы-нефтедеструкторы продуцируют гликолипидные биоПАВ. Преобладающим среди гомологичных дирамнолипидов псевдомонад (*P. fluorescens* 142NF и *P. putida* BS3701), предположительно, является рамнолипид В, содержащий два остатка рамнозы, два остатка декановой и один остаток деценовой кислот. Исследованные штаммы родококков (*Rhodococcus* sp. X5 и *Rhodococcus* sp. S26) образуют соединения трегалолипидной природы, два из которых идентифицированы как сукциноил-диоктаноил-деканоил трегалоза и сукциноил-октаноил-дидеканоил трегалоза.

## **5 Составление ассоциаций микроорганизмов, перспективных для использования в составе биопрепаратов**

### **5.1 Составление и отбор ассоциаций микроорганизмов, способных к деградации углеводородов нефти при пониженной температуре**

Были использованы два подхода для создания ассоциации штаммов – деструкторов углеводородов нефти:

1) комбинирование микроорганизмов в ассоциации на основании анализа их физиологических, метаболических и деградативных свойств, наличия плазмид;

2) селекция смешанной ассоциации наиболее активных микроорганизмов при периодическом культивировании в жидкой минеральной среде с нефтью в качестве единственного источника углерода и энергии.

Эти два подхода были использованы для девяти микроорганизмов-деструкторов, отобранных в пункте 1.1, а именно: *Microbacterium* sp. Ars25, *Rhodococcus* sp. X5, *Rhodococcus* sp. X25, *Rhodococcus* sp. S26, *Rhodococcus* sp. S25, *Rhodococcus* sp. S67, *Rhodococcus equi* Ars38, *Pseudomonas fluorescens* 142NF(pNF142), *Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142).

С помощью первого подхода на основании анализа физиологических и метаболических характеристик микроорганизмов, отобранных в п. 1.1 наиболее активных деструкторов был предложен следующий вариант ассоциации, состоящей из четырёх штаммов: *Pseudomonas fluorescens* 142NF(pNF142), *Rhodococcus* sp. X5, *Rhodococcus* sp. S25, *Rhodococcus* sp. S67.

Для селекции микроорганизмов с помощью второго подхода девять выбранных штаммов культивировали в жидкой минеральной среде с 2% нефти. В результате проведённых экспериментов была отселектирована ассоциация микроорганизмов, состоящая из *Pseudomonas fluorescens* 142NF(pNF142), *Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142), *Rhodococcus* sp. X5, *Rhodococcus* sp. S67. После десяти суток культивирования при 24°C 57% от общей популяции микроорганизмов составляли псевдомонады, а при 4°C — 90% от общей популяции. При 24°C 80% всей популяции родококков было представлено штаммами *Rhodococcus* sp. X5 и *Rhodococcus* sp. S67; при 4°C эти два штамма составляли 70% общей популяции родококков.

Таким образом, с помощью двух различных подходов составлены микробные ассоциации из четырёх штаммов-деструкторов каждая, причём три из четырёх микроорганизмов, входящих в состав каждой из ассоциации, являются одинаковыми. Для выбора наиболее эффективной ассоциации было проведено сравнение степени деструкции нефти. Показано, что ассоциация, отобранная в ходе селекции микроорганизмов, эффективней утилизирует углеводороды нефти: 11.4% против 7.8% за 10 суток культивирования в жидкой минеральной среде с 2% нефти при температуре 4-6°C. Эта ассоциация микроорганизмов: *Rhodococcus* sp. X5, *Rhodococcus* sp. S67, *Pseudomonas fluorescens* 142NF(pNF142), *Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142), послужила основой биопрепарата «МикроБак».

Отличительными особенностями данной микробной ассоциации «МикроБак» является сочетание следующих свойств: во-первых, способность к росту и деградации углеводородов в широком диапазоне температур (от 4 до 32°C), что определяет возможность ее использования при биоремедиации нефтезагрязнённых территорий в разных регионах России; во-вторых, деградация нефтепродуктов и нефти в присутствии 3–5% NaCl; в-третьих, микроорганизмы синтезируют биоэмульгаторы и обладают высокой эмульгирующей активностью при культивировании в минеральных средах с использованием в качестве источника углерода и энергии нефтепродуктов; в-четвёртых, бактерии рода *Pseudomonas* обладают конъюгативными плазмидами биodeградации ПАУ; наличие же таких плазмид увеличивает деградативный потенциал путем распространения генов среди аборигенных микроорганизмов.

## **5.2 Составление ассоциации штаммов, способных к деградации высоких концентраций нефти в широком температурном и pH-диапазонах**

На основании физиологических, метаболических и деградативных свойств микроорганизмов (п. 1.2), были отобраны следующие бактерии: *Acinetobacter baumannii* 1B, *Acinetobacter baumannii* 7, *Pseudomonas putida* F701, *Rhodococcus erythropolis* S26, *Rhodococcus* sp. S25, *Serratia* sp. 6.

Далее выбранные шесть штаммов были внесены в жидкую минеральную среду (pH 4) с 15% нефти при 4°C или 24°C. Бактерии *Acinetobacter baumannii* 1B, *Acinetobacter baumannii* 7, *Pseudomonas putida* F701 и *Rhodococcus erythropolis* S26 количественно преобладали в смешанной популяции через десять суток культивирования. В результате перечисленные микроорганизмы вошли в состав ассоциации «ВиО».

Следует подчеркнуть, что бактерии *Acinetobacter baumannii* 1B и *Acinetobacter baumannii* 7 несут плазмиды биodeградации гексадекана, а у штамма *Pseudomonas putida* F701 в составе конъюгативной плазмиды pF701a есть гены биodeградации нафталина. Таким образом, отобранная ассоциация плазмидосодержащих штаммов-деструкторов перспективна для очистки водных и почвенных экосистем от загрязнения высокими концентрациями нефтепродуктов в широком температурном (4 – 42°C) и pH (4 - 10) диапазонах.

## 6 Сравнительная эффективность деструкции нефти и дизельного топлива опытными образцами биопрепаратов «МикроБак», «ВиО» и биопрепаратом «Биоойл» в жидкой минеральной среде

Сравнение эффективности опытных образцов биопрепаратов «МикроБак» и «ВиО» проводили с одним из наиболее востребованных на рынке РФ коммерческим биопрепаратом «Биоойл» (ЗАО «Биоойл», г. Новосибирск), состоящим из микроорганизмов родов *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*.

Результаты деструкции нефти при культивировании ассоциации «ВиО» и биопрепаратов «Биоойл» и «МикроБак» в жидкой минеральной среде с 15% нефти при температурах 4°C и 24°C в течение 30 суток приведены на рисунке 6. Наибольшая степень убыли нефти наблюдалась для консорциума «ВиО» как при 4°C (45%) так и при 24°C (38%). Потребление нефти бактериями, входящими в состав биопрепаратов «МикроБак» (степень деструкции 40% при 4°C и 34% при 24 °C) и «Биоойл» (степень деструкции 36% при 4°C и 37% при 24°C) происходило дольше, что, возможно, связано с длительной адаптацией (подтверждается данными соответствующих кривых роста).

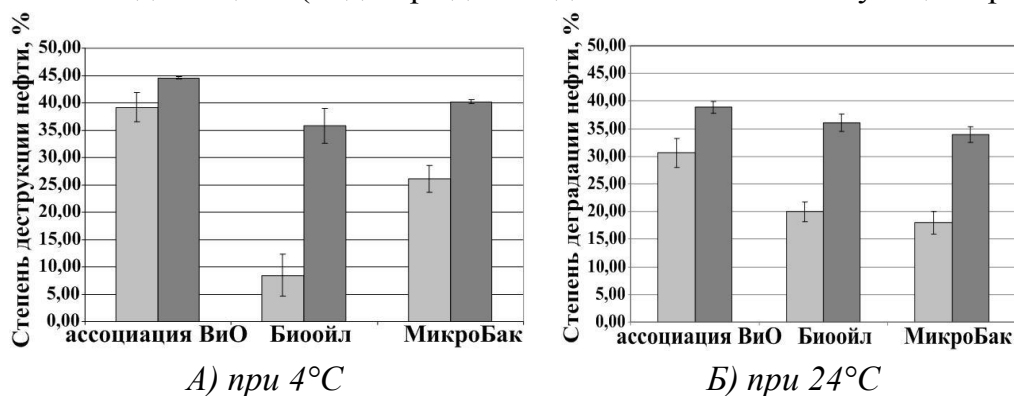


Рис. 14 Деструкция нефти (за вычетом абиотической убыли) ассоциацией «ВиО» и биопрепаратами «Биоойл» и «МикроБак» в жидкой минеральной среде с 15% нефти (серые столбцы — через 15 суток, темные столбцы — через 30 суток)

Эксперименты по деградации нефти в присутствии 3% морской соли продемонстрировали наилучшие показатели эффективности деструкции нефти в концентрации 15% консорциумом «ВиО» — 33% при 4°C и 21% при 24°C. При температуре 4°C наибольшая убыль нефти наблюдалась в системе инокулированной ассоциацией «ВиО», в системах с биопрепаратами «Биоойл» и «МикроБак» показатели убыли были ниже. При комнатной температуре степень деградации нефти ассоциацией «ВиО» и биопрепаратом «МикроБак» была одинаковой. Наличие морской соли в системе снижало эффективность деградации нефти приблизительно на 10-15% по сравнению с данными рисунка 14.

В жидкой минеральной среде с добавлением 15% дизельного топлива и 3% морской соли при низкой температуре (4°C) степень деструкции нефти была максимальной (63%) для ассоциации «ВиО». В мезофильных условиях (24°C) консорциум «ВиО» также демонстрировал более высокие показатели деструкции дизельного топлива (61%), по сравнению с биопрепаратами «МикроБак» (37%) и «Биоойл» (30%). Возможно, микроорганизмы этих биопрепаратов слабоустойчивы к

токсичным низкомолекулярным соединениям дизельного топлива. Для дизельного топлива наблюдалась увеличение степени деструкции во всех вариантах по сравнению с результатами по убыли нефти (Рис. 14). По-видимому, это связано с тем, что в состав дизельного топлива входят легкоразлагаемые микроорганизмами углеводороды по сравнению с многокомпонентным составом нефти.

В целом, все три биопрепарата более эффективны при низкой температуре. Во всех проведенных экспериментах консорциум «ВиО» был самым эффективным при деградации нефти и дизельного топлива.

## **7 Сравнительная эффективность деструкции нефти опытными образцами биопрепаратов «МикроБак», «ВиО» и биопрепаратом «Биоойл» в лабораторном почвенном эксперименте**

Оценку эффективности биопрепаратов проводили в модельных нестерильных почвенных системах, загрязненных 2% нефти при комнатной температуре (18-25°C) (Табл. 2): оценивали вклад аборигенных микроорганизмов в деградацию углеводородов, исследовали степень деструкции нефти и изменение численности интродуцированных и аборигенных микроорганизмов.

Внесение в почву бактериальных препаратов «Биоойл», «ВиО» и «МикроБак» способствовало повышению степени деградации загрязнителя и увеличению численности углеводородокисляющих микроорганизмов. В модельных системах 3-5 на порядок выросла общая численность нефтедеструкторов за счет физиологической и метаболической активности интродуцированных штаммов-деструкторов по сравнению с контролем (микркосм 1).

Табл. 2. Убыль нефти в модельных системах (2% загрязнителя) через 42 дня

Микрокосмы		Убыль нефти, %
1	Контроль без внесенных микроорганизмов и нитроаммофоски	23±4
2	Контроль без внесенных микроорганизмов + нитроаммофоска	31±3
3	Ассоциация «МикроБак» + нитроаммофоска	51±5
4	Биопрепарат «Биоойл» + нитроаммофоска	45±3
5	Ассоциация «ВиО» + нитроаммофоска	59±2

В общем, в ходе лабораторных испытаний продемонстрирована более эффективная утилизация углеводородов нефти опытным образцом биопрепарата «ВиО» (59%) по сравнению с препаратами «МикроБак» (52%) и «Биоойл» (45%).

## **8 Раздельное и совместное культивирование микроорганизмов-нефтедеструкторов**

Культивирование микроорганизма *P. fluorescens* 142NF проводили в полусинтетической питательной среде на основе гидролизата казеина и дрожжевого автолизата (КГКДА) с добавлением салицилата натрия, поскольку салицилат является индуктором ферментов деградации полиароматических углеводородов (Van Hamme et al., 2003). Следовательно, выращенные в таких условиях микроорганизмы будут обладать способностью к наиболее полной деградации компонентов нефти. В другом случае использовали добавку дизельного топлива как одного из наиболее

распространённых нефтепродуктов. После добавления в культуральную среду салицилата (через девять часов) скорость роста возросла, что сопровождалось быстрым увеличением численности микроорганизмов. В результате, получили 160 г биомассы с численностью микроорганизмов в концентрированной суспензии  $4.2 \times 10^{10}$  КОЕ/г биомассы.

Выращивание родококка *Rhodococcus* sp. S67 проводили в полусинтетической питательной среде КГКДА с добавлением пептона. Лаг-фаза (8 ч) была в два раза больше, чем для псевдомонад. Общее время процесса составило 24 ч с выходом биомассы 200 г с численностью микроорганизмов  $1.3 \times 10^{11}$  КОЕ/г.

Совместное культивирование микроорганизмов применяют для снижения себестоимости конечного продукта ферментации. Показано успешное использование смешанных культур для приготовления бактериальных препаратов, что позволило реализовать экономические преимущества такого подхода (Куюкина и др., патент 2180276 РФ; Мурыгина и др., патент 2174496 РФ). Также известно, что микроорганизмы родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas* могут повышать эффективность окисления нефти в совместной культуре (Van Hamme et al., 2001).

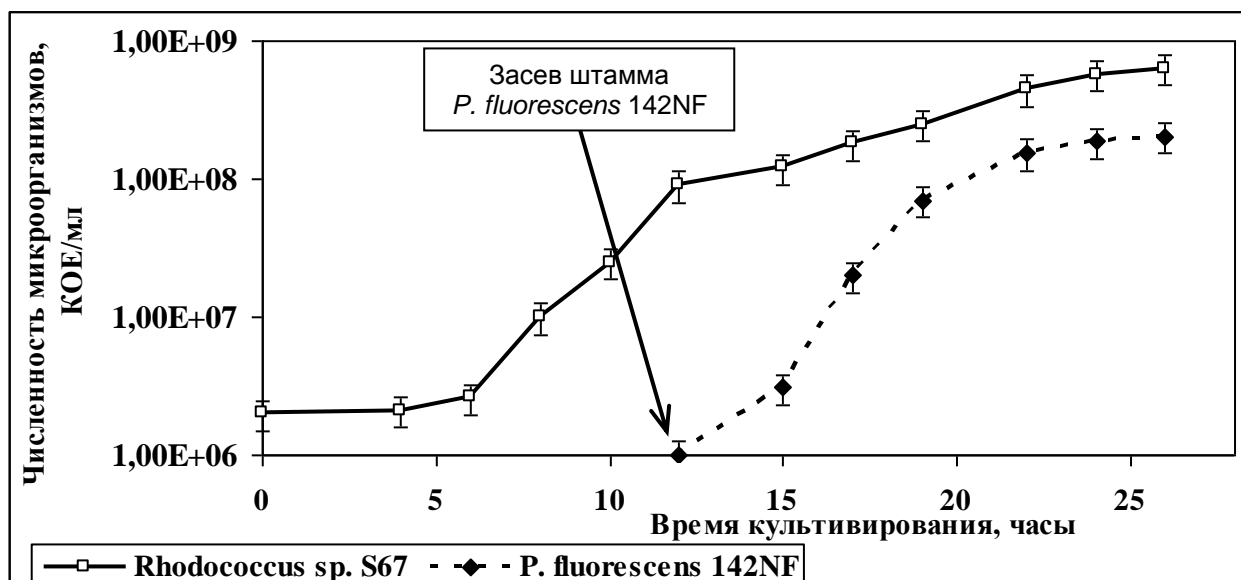


Рис. 15 Динамика численности микроорганизмов *Rhodococcus* sp. S67 и *P. fluorescens* 142NF при их совместной ферментации

Данные динамики роста данных микроорганизмов при одинаковых условиях позволили проанализировать возможность осуществления их совместного культивирования (Рис. 15). Поскольку скорость роста у псевдомонад выше, чем у родококков, посевной материал быстрорастущей культуры *P. fluorescens* 142NF вносили с задержкой, составившей 12 часов. После инокуляции культурой псевдомонад скорость роста родококков резко упала. Скорость роста псевдомонад при росте в смешанной культуре была ниже, чем в монокультуре, но при этом отсутствовала лаг-фаза. Оба микроорганизма достигли стационарной фазы роста при близкой численности, что оптимально для использования в биопрепарате. Совместная ферментация по основным показателям (Табл. 3) практически не уступает отдельным; преимущества очевидны: количество технологических операций снижается почти в два раза. Таким образом, для



наработки биопрепаратов исследуемых штаммов-нефтедеструкторов совместное культивирование целесообразно.

Табл. 3. Основные характеристики микроорганизмов *P. fluorescens* 142NF и *Rhodococcus* sp. S67 при ферментации в монокультуре и в смешанной культуре

Ферментация	Общее время процесса, ч	Удельная скорость роста $\mu$ , $ч^{-1}$	Выход биомассы, г	Численность микроорганизмов (в концентрированной суспензии), КОЕ/г
<i>P. fluorescens</i> 142NF (с салицилатом)	14	1.2	160	$(4.2 \pm 0,6) \times 10^{10}$
<i>P. fluorescens</i> 142NF (с ДТ)	23	0.5	136	$(1.1 \pm 0,1) \times 10^{11}$
<i>Rhodococcus</i> sp. S67	24	0.5	200	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^{11}$
В смешанной культуре	26	P. <sup>1)</sup> — 0.5	208	P. — $(3.4 \pm 0.4) \times 10^{10}$
		R. <sup>2)</sup> — 0.3		R. — $(3.8 \pm 0.4) \times 10^{10}$

<sup>1)</sup> — *P. fluorescens* 142NF; <sup>2)</sup> — *Rhodococcus* sp. S67

### 9 Получение различных форм микробной биомассы и их хранение

Динамику численности бактерий при хранении их в жидкой форме изучали для микроорганизмов *P. fluorescens* 142NF и *Rhodococcus* sp. S67. Показано, что 0.2% раствор бензоата натрия показывает наилучший консервирующий эффект: через два месяца хранения отмечена максимальная выживаемость как для псевдомонад, так и для родококков (0.17% и 3.0%, соответственно). Известно, что механизм действия бензоата основан на ингибировании фосфофруктокиназы при проникновении внутрь клетки (Krebs et al., 1983). Очевидно, что такое замедление жизнедеятельности бактерии способствует её наилучшему сохранению.

К распространённым способам подготовки микроорганизмов к длительному хранению относятся такие методы, как лиофилизация и высушивание на носителе (контактная сушка). Микроорганизмы лиофилизировали с применением трех вариантов защитных сред: 20% сахароза; 10% сахароза и 6% тиомочевина; 8% сахароза, 4% тиомочевина и 4% полиглюкин. Эффективность оценивали по проценту жизнеспособных клеток в сухом материале сразу после высушивания. При лиофилизации биомассы штамма *P. fluorescens* 142NF максимальная выживаемость достигнута с использованием раствора сахарозы (Рис. 16). Для бактерий штамма *Rhodococcus* sp. S67 наиболее эффективное защитное действие оказал вариант «сахароза + тиомочевина + полиглюкин». За шесть месяцев хранения полученных образцов при комнатной температуре выживаемость микроорганизмов в них снизилась более чем на два порядка, составив менее одного процента как для псевдомонад, так и для родококков.

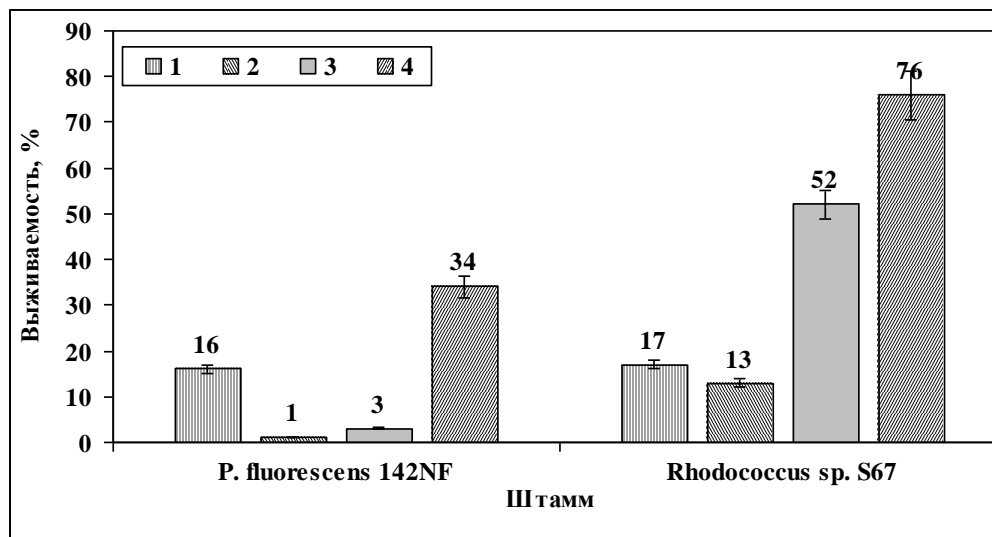


Рис. 16 Выживаемость микроорганизмов после лиофилизации и контактной сушки: 1 — лиофилизация с сахарозой; 2 — лиофилизация с сахарозой и мочевиной; 3 — лиофилизация с сахарозой, мочевиной и полиглюкином; 4 — контактная сушка

При другом способе длительного хранения микроорганизмов использовали контактную сушку на носителе (перлит) с защитной средой (10% сахарозы, 4% тиомочевины, 4% полиглюкина, 2% аскорбиновой кислоты). Согласно результатам (Рис. 16) данный способ подготовки биомассы к хранению выгоднее лиофилизации благодаря более высокой выживаемости (в два раза выше для псевдомонад и в 1.5 раза выше для родококков). При хранении полученных контактной сушкой образцов при различной температуре максимальную численность жизнеспособных микроорганизмов наблюдали в образцах при  $-20^{\circ}\text{C}$  (рис.17–18). После резкого падения выживаемости в первый месяц она стабилизировалась и к концу шестого месяца составляла для псевдомонад 24% и для родококков 20%.

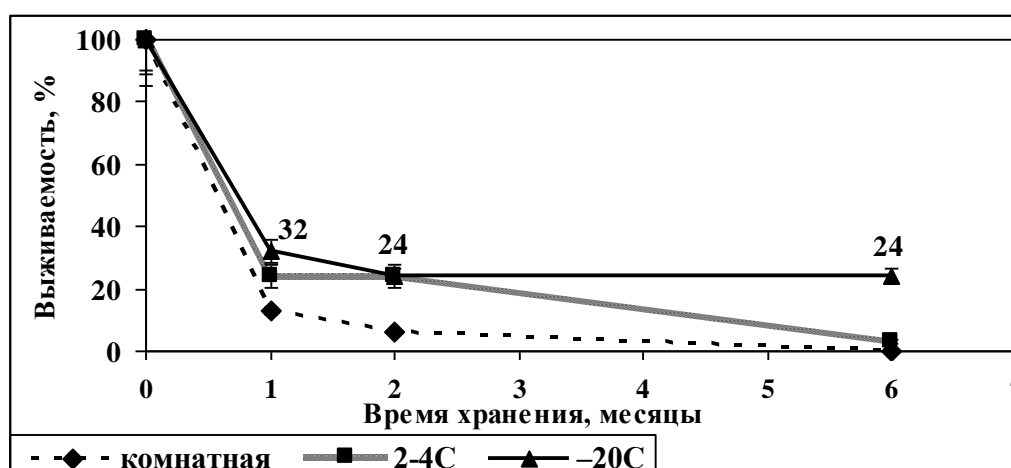


Рис. 17 Динамика выживаемости клеток *P. fluorescens* 142NF при разных температурах во время хранения после контактной сушки

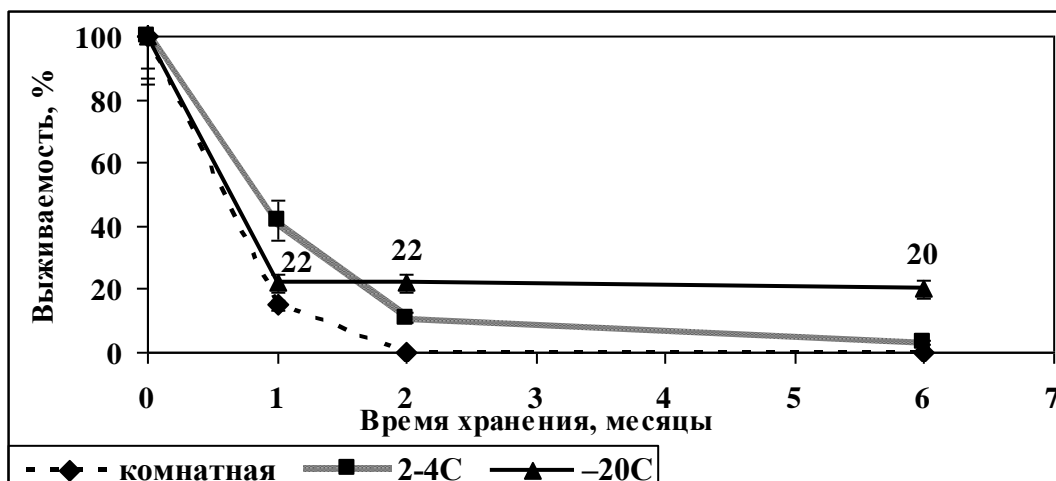


Рис. 18 Динамика выживаемости микроорганизмов *Rhodococcus sp. S67* при хранении после контактной сушки при разных температурах

Для оценки деградирующей активности сухих препаратов проводили лабораторный модельный эксперимент в жидкой среде Эванса (2% нефти, 20 дней культивирования). Инокуляцию осуществляли препаратами, полученными контактной сушкой после двух недель хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$ . В качестве контроля брали свежесобранный нативную биомассу соответствующего микроорганизма. Полученные данные (Рис. 19) свидетельствуют о сохранении достаточно высокой нефтеокислительной активности, что свидетельствует об эффективности выбранного способа хранения.

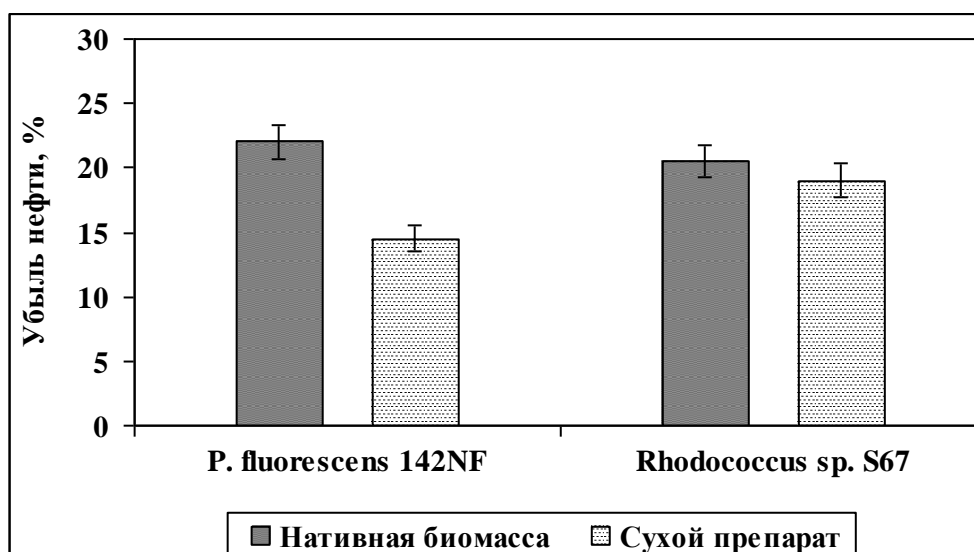


Рис. 19 Сравнение деградативной активности (за вычетом абиотической убыли нефти) микроорганизмов, «оживлённых» из сухого образца биопрепарата и нативной биомассы (культуральной жидкости) в жидкой среде Эванса при одинаковой посевной дозе

В результате показано, что для подготовки биомассы микроорганизмов-нефтедеструкторов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* для длительного хранения предпочтительна контактная сушка с вышеупомянутой защитной средой. Максимальная выживаемость клеток достигается при хранении сухих препаратов в условиях низких

температур ( $-20^{\circ}\text{C}$ ); деградационная активность в отношении углеводов нефти сохраняется.

## 10 Мониторинг интродуцированных в окружающую среду штаммов-нефтедеструкторов

Представителей рода *Pseudomonas* различали по культурально-морфологическим признакам (размер и форма колоний), а также устойчивости к различным антибиотикам: для 142NF — ампициллину (500 мкг/мл), для BS3701 — рифампицину (100 мкг/мл). Дополнительным маркером штамма BS3701 была зелёная флюоресценция колоний в УФ-свете ( $\lambda=254$  нм) при росте на агаризованной среде Кинга Б.

Для определения родококков, входящих в состав ассоциаций, было проведено генотипирование. С этой целью применяли RAPD- (Random Amplified Polymorphic DNA) анализ с использованием четырех праймеров: OA20 (GTTGCGATCC), OG06 (GTGCCTAACC), OS09 (TCCTGGTCCC) и OS14 (AAAGGGGTCC). Максимальное различие между штаммами было выявлено при использовании праймера OA20 (Рис. 20), который в дальнейшем был использован для мониторинга штаммов родококков после их интродукции в окружающую среду.

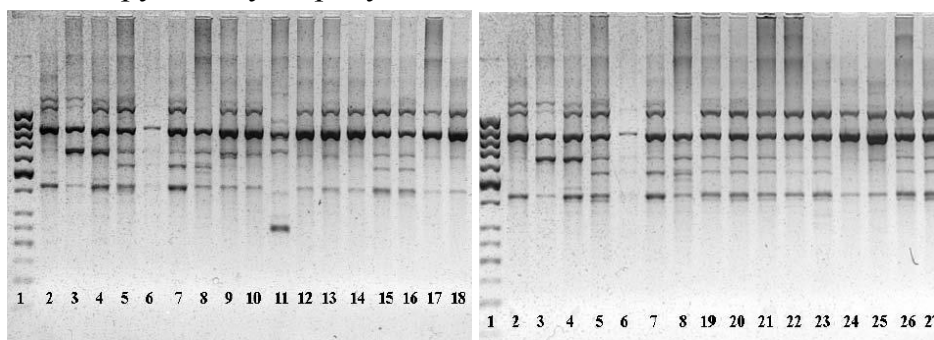


Рис. 20 RAPD-анализ штаммов родококков с праймером OA20 после культивирования в жидкой минеральной среде с 2% нефти. 1-50 pb Ladder (Fermentas); 2- *Rhodococcus* sp. S25; 3- *Rhodococcus* sp. S26; 4- *Rhodococcus* sp. S67; 5- *Rhodococcus* sp. X5; 6 - *Rhodococcus* sp. X25; 7- *Microbacterium* sp. Ars25; 8- *Rhodococcus* sp. Ars38; 9-27- клоны, составляющие большую часть популяции

## 11 Полевые испытания опытного образца биопрепарата «МикроБак» для очистки почвы от загрязнений нефтепродуктами и нефтью

Эффективность опытного образца биологического препарата «МикроБак» исследовали в ходе полевых испытаний по очистке почвы от загрязнений нефтью и нефтепродуктами на территории ОАО «Тюльская Топливо-Энергетическая Компания» с сентября по ноябрь 2007 года при низкой температуре окружающей среды ( $8-15^{\circ}\text{C}$ ). Использовали грунт, загрязненный при аварийных разливах нефтепродуктов (мазут, бензин, дизельное топливо, газовый конденсат) и прорывов трубопроводов. В почву вносили жидкую форму опытного образца биопрепарата, состоящего из микроорганизмов-нефтедеструкторов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*. При интродукции биопрепарата вносили также минеральное удобрение – источник азота, фосфора и калия. Эффективность биоремедиации грунта оценивали по уменьшению общего содержания углеводов. Результаты проведенных полевых испытаний по

очистке грунта, загрязнённого упомянутым комплексным загрязнителем показали, что в течение месяца содержание остаточных углеводов нефтепродуктов снизилось на 99,6% благодаря одновременному внесению биопрепарата и минерального удобрения (на контрольном участке деградация нефтепродуктов составила 90,7%).

Таким образом, при проведении полевых испытаний показана высокая эффективность биоремедиации *in situ* с помощью опытного образца биопрепарата «МикроБак».

## **12 Разработка растительно-микробных ассоциаций для биоремедиации нефтезагрязненных почв**

Вместе с микроорганизмами существенную роль в деградации различных поллютантов, в том числе ПАУ и сырой нефти, играют растения, поэтому при очистке почвы от нефти и нефтепродуктов, по-видимому, следует комбинировать свойства микроорганизмов-деструкторов и растений, связанных с ними.

Был проведен скрининг более 20 видов различных растений для создания эффективных растительно-микробных ассоциаций. Самыми устойчивыми к загрязнению нефтью (2%) оказались кукуруза, подсолнечник, некоторые бобовые, ячмень и газонная трава (смесь злаков на основе овсяницы красной). Данные растения имели развитую корневую систему, наибольший объем почвы занимали корни ячменя и газонной травы, которая также имела густую надземную биомассу.

Таким образом, получены растительно-микробные ассоциации: «ВиО» - ячмень и «ВиО» - газонная трава. Далее оценивали составленные консорциумы по эффективности в отношении почв, загрязненных нефтью. Поскольку ячмень – стандартный вид растений, часто используемый в лабораторных исследованиях, а газонная трава является смесью разных видов злаков, в дальнейших экспериментах использовали микробно-растительную ассоциацию «ВиО» - ячмень.

### **12.1 Оценка эффективности деградации нефти растительно-микробными ассоциациями «ВиО» - ячмень в стерильных модельных почвенных системах**

Проводили оценку эффективности деструкции углеводов нефти при 24°C в стерильных условиях при использовании ассоциации ячменя с каждым из штаммов (*Rhodococcus erythropolis* S26, *Acinetobacter baumannii* 1B, *Acinetobacter baumannii* 7, *Pseudomonas putida* F701), а также с консорциумом микроорганизмов «ВиО».

Внесение микроорганизмов и семян ячменя в почвенные модельные системы с нефтью способствовало снижению токсичности почвы, что отразилось на длине побега по сравнению с отрицательным контролем (растения + нефть без микроорганизмов). Возможно, данный факт обусловлен способностью бактерий колонизировать корни растений и ризосферу, снижая тем самым отравляющий эффект нефти благодаря катаболической активности.

Численность штаммов на корнях была выше на один-два порядка, чем в ризосфере, что связано с потреблением бактериями питательных веществ, содержащихся в корневых экссудатах. Показано (Барышникова с соавт., 2001), что при совместном культивировании численность родококков снижалась более чем на порядок

при одновременном увеличении численности псевдомонад. В нашей работе анализ численности каждого из штаммов при совместной инокуляции в составе микробно-растительной ассоциации «ВиО» - ячмень показал отсутствие существенных колебаний в концентрации микроорганизмов по сравнению с отдельной интродукцией, т.е. негативных взаимодействий (конкуренции).

Степень деградации нефти в модельных системах оценивали через десять суток эксперимента (Рис. 21).

При использовании растительно-микробных ассоциаций *Pseudomonas putida* F701– ячмень, *Acinetobacter baumannii* 7 - ячмень, *Acinetobacter baumannii* 1В - ячмень, *Rhodococcus erythropolis* S26 - ячмень нефть убывала медленнее (степень деградации около 10%), чем при использовании ассоциации «ВиО» с растениями (19%).

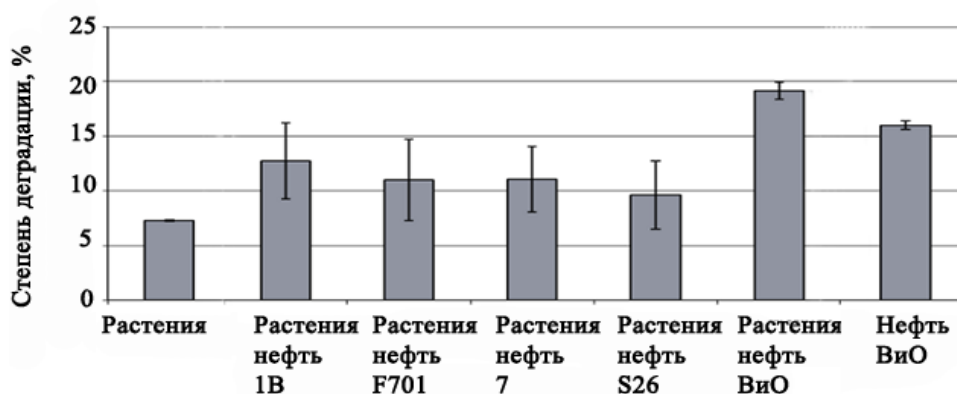


Рис. 21 Убыль нефти в стерильной модельной почве с растительно-микробными ассоциациями «ВиО»-ячмень и отдельными штаммами в течение десяти суток

В процессе биodeградации нефти ассоциацией микроорганизмов между бактериями могла происходить кооперация, и утилизация углеводов нефти происходила эффективнее, причем растения зачастую вносят вклад в работу растительно-микробных ассоциаций (7%) за счет своих собственных ферментных систем и механизмов детоксикации поллютантов. Известно (Naumann et al. 1991), что взаимодействие корней растений с органическими соединениями (включая углеводороды нефти) индуцирует пероксидазную активность. Пероксидаза является компонентом защитного внутриклеточного механизма и прямо влияет на деградацию поллютантов в окружающей среде.

Таким образом, консорциум «ВиО» совместно с растениями (ячменём) – эффективный инструмент для ремедиации загрязненных нефтью почв (вследствие отсутствия отрицательных взаимодействий, влияющих на скорость и эффективность утилизации нефти, численность микроорганизмов и развитие растений, ассоциированных со штаммами-деструкторами).

### 13 Полевые испытания растительно-микробной ассоциацией «ВиО» — ячмень и коммерческих биопрепаратов ЗАО «Биоилл» в условиях реального разлива нефти

Эффективность растительно-микробной ассоциации оценивали в полевых испытаниях (территория нефтяных месторождений Ямало-Ненецкого автономного

округа) в течение двух месяцев. При обработке сайта ассоциацию «ВиО» сравнивали с эффективностью биопрепаратов «Биоойл-СН» и «Биоойл-Югра». В летний период почва прогревалась до 10°C при колебаниях температуры воздуха от -2 до +24°C.

На участке, обработанном ассоциацией «ВиО», степень очистки через 2 месяца была заметно выше (89%) по сравнению с двумя другими биопрепаратами (70-75%), причем уже через месяц уровень деструкции составил 80% (Рис. 22).

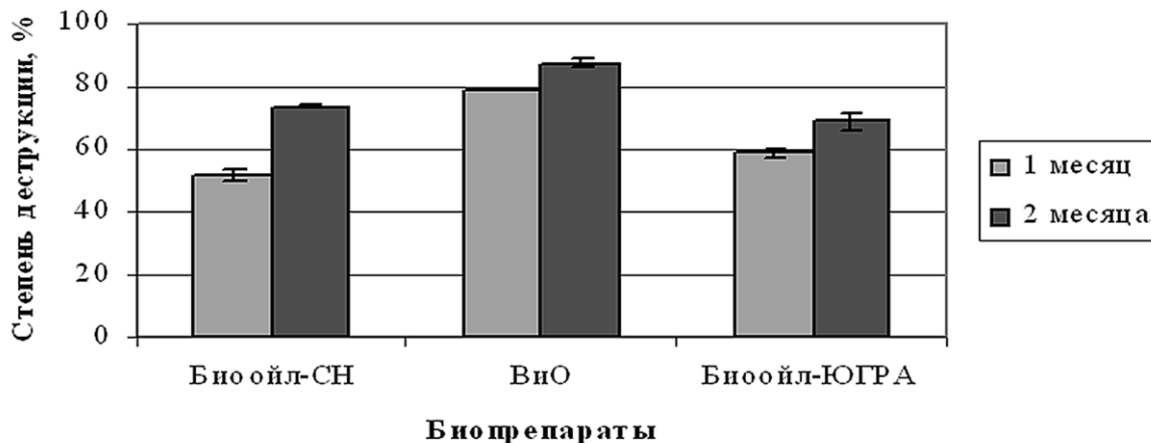


Рис. 22 Эффективность использования в почве растительно-микробных ассоциаций «биопрепарат — ячмень» для деградации нефти

Таким образом, показана эффективность биоремедиации *in situ* микробно-растительной ассоциацией «ВиО» — ячмень в условиях перепада температуры.

Заключения о высокой эффективности биодеградации нефти ассоциацией «ВиО» получены от ОАО «Газпромнефть-Ноябрьскнефтегаз», ООО «Газпромнефть-Восток», «Сибнефть-Восток», ЗАО «Биоойл».

## 14 Депонирование штаммов, изучение их патогенности, патенты и товарный знак

### 14.1 Депонирование штаммов

Исследованные культуры самых активных микроорганизмов – деструкторов углеводородов нефти из опытного образца биопрепарата «Микробак» были депонированы во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов на базе Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН под следующими номерами:

*Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142) — ВКМ В-2380Д,

*Pseudomonas* sp. 142NF(pNF142) — ВКМ В-2387Д,

*Rhodococcus* sp. X5 — ВКМ Ас-2532Д,

*Rhodococcus* sp. S67 — ВКМ Ас-2533Д.

Штаммы микроорганизмов, входящие в состав опытного образца биопрепарата «ВиО», были депонированы в коллекции культур микроорганизмов Научно-исследовательского института «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» под следующими номерами: *Acinetobacter baumannii* 1В — В1075; *Acinetobacter baumannii* 7 — В1073; *Rhodococcus erythropolis* S26 - В1072; *Pseudomonas putida* F701 — В1074.

### 14.2 Изучение патогенности микроорганизмов

Штаммы опытного образца биопрепарата «Микробак» прошли санитарно-гигиеническую оценку в Научно-исследовательском центре токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов, в опытах на лабораторных животных оценивали показатели токсичности, токсигенности, вирулентности, диссеминации; штаммы отнесены к IV классу опасности микроорганизмов (непатогенные) и удовлетворяют требованиям, предъявляемым к промышленным микроорганизмам.

Штаммы, входящие в состав опытного образца биопрепарата «ВиО», прошли санитарно-гигиеническую оценку в ФГУН «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Штаммы были испытаны в соответствии с Методическими указаниями Минздрава СССР № 4263-87, №2620-82 и с учетом рекомендаций ВОЗ (Бюл. ВОЗ, 1981, № 6, с.20-27). Было установлено, что эти штаммы непатогенны для теплокровных животных и птиц, относятся к IV классу опасности микроорганизмов (малоопасны) и удовлетворяют требованиям, предъявляемым к промышленным микроорганизмам.

### **14.3 Патенты, товарный знак, технические условия, сертификат соответствия и экспертное заключение**

По результатам работы получены пять патентов РФ на штамм микроорганизмов, ассоциацию микроорганизмов, биопрепарат, способ его получения и применения, а также на способ получения сухой формы биопрепарата и способ его активации. Зарегистрирован товарный знак биопрепарата «МикроБак».

На биопрепарат «МикроБак» разработаны и зарегистрированы Технические условия, получены Сертификат соответствия и Экспертное Заключение о соответствии требованиям «Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)», утвержденным решением Комиссии таможенного союза № 299 от 28.05. 2010 г. гл. II, разд. 15. Таким образом, биопрепарат «Микробак» может применяться на территориях Российской Федерации, Республики Беларусь и Республики Казахстан.

## **ВЫВОДЫ**

1. В результате скрининга 220 штаммов-деструкторов углеводородов нефти на основании детального анализа их свойств отобрано 15 наиболее эффективных психротрофных штаммов-нефтедеструкторов, способных к деградации высоких концентраций нефти и нефтепродуктов (до 30%) в присутствии соли (до 5% NaCl) в температурном диапазоне (4-42°C) при значениях pH от 4 до 10, а также образующих биоэмульгаторы. Штаммы принадлежат к родам *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Micrococcus* и *Serratia*.

2. Впервые оценен вклад плазмид биodeградации ароматических углеводородов в повышение степени микробной деструкции углеводородов нефти. Выделены и охарактеризованы новые плазмиды биodeградации ПАУ pAP4, pAP5, pAP35, pAP36, pBS3950. Показано, что в открытой почве как в присутствии загрязнителя (нафталина), так и без него происходит горизонтальный перенос меченой



плазмиды биодegradации нафталина из интродуцированного штамма в почвенные бактерии рода *Pseudomonas*.

3. Впервые для бактерий видов *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas fluorescens* при росте на углеводородах продемонстрировано образование биоПАВ, идентичных рамнолипиду типа В. Штаммы родококков *Rhodococcus* sp. X5 и *Rhodococcus* sp. S26 образуют соединения гликолипидной природы, два из которых отнесены к сукциноилтрегалолипидам. Изученные бактерии-нефтедеструкторы родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* синтезируют биосурфактанты разных типов при росте на гидрофильных (глюкоза) и на гидрофобных (гексадекан) субстратах

4. Впервые с использованием разработанного метода мониторинга удалось проследить за судьбой интродуцированных микроорганизмов-деструкторов нефти в условиях полевого эксперимента. Доля интродуцированных штаммов со временем возрастала и составляла более 70% от численности культивируемых микроорганизмов-нефтедеструкторов через 6 месяцев эксперимента.

5. Показана возможность глубинного периодического культивирования психротрофных микроорганизмов-нефтедеструкторов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* в смешанной культуре с высоким выходом биомассы (с численностью родококков  $3,8 \times 10^{10}$  КОЕ/г и псевдомонад –  $3,4 \times 10^{10}$  КОЕ/г концентрированной суспензии). На основе этого метода разработана технология получения биопрепарата «МикроБак».

6. Разработан способ контактного высушивания биомассы штаммов-нефтедеструкторов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*, позволяющий сохранить деградативную активность микроорганизмов и повысить их выживаемость в сухом препарате в 1,5–2 раза по сравнению с лиофилизацией.

7. Разработан, испытан и запатентован биопрепарат «МикроБак» (*Pseudomonas* spp., *Rhodococcus* spp.) для очистки почв и грунтов от нефтяных загрязнений в условиях холодного и умеренного климата. Разработан и испытан опытный образец биопрепарата «ВиО» (*Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp., *Acinetobacter* spp.) для эффективной деградации высоких концентраций нефти (до 30%) в широком диапазоне температур (4–42°C) при значениях рН от 4 до 10.

8. Лабораторные испытания опытных образцов биопрепаратов «МикроБак» и «ВиО» продемонстрировали их высокую эффективность по сравнению с известными коммерческими биопрепаратами. Полевые испытания биопрепарата «МикроБак» при пониженной температуре (от 0 до +22°C) показали, что за 2 месяца в зависимости от условий он способен утилизировать от 50 до 90% нефти и дизельного топлива.

9. Для повышения эффективности деградации нефти в почве разработаны растительно-микробные ассоциации, из которых наиболее перспективной оказалась «ВиО-ячмень». Деградация нефти этой ассоциацией на территории нефтяных месторождений Ямало-Ненецкого автономного округа за 2 месяца при температуре от -2 до +24°C была на 20% более эффективной, чем ассоциацией ячменя с другими коммерческими биопрепаратами.

## СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Экспериментальные статьи в рецензируемых журналах

1. Boronin A.M., Filonov A.E., Gayazov R.R., Kulakova A.N. and Mshensky Y.N. Growth and plasmid-encoded naphthalene catabolism of *Pseudomonas putida* in batch culture // **FEMS Microbiology Letters**. 1993. V. 113. P. 303–308.
2. Решетилов А.Н., Ильясов П.В., Слепенькин А.В., Старовойтов И.И., Филонов А.Е., Гаязов Р.Р., Боронин А.М. Бактерии рода *Pseudomonas* как рецепторный элемент микробных сенсоров для детекции ароматических ксенобиотиков // **Доклады Российской Академии наук**. 1996. Т. 348. С. 552–555.
3. Грищенко В.Г., Гаязов Р.Р., Токарев В.Г., Кочетков В.В., Филонов А.Е., Боронин А.М. Бактериальные штаммы-деструкторы топочного мазута: характер деградации в лабораторных условиях // **Прикладная биохимия и микробиология**. 1997. Т. 33. № 4. С. 423–427.
4. Filonov A.E., Duetz W.A., Karpov A.V., Gaiazov R.R., Kosheleva I.A., Breure A.M., Filonova I.F., van Andel J.G. and Boronin A.M. Competition of plasmid-bearing *Pseudomonas putida* strains catabolizing naphthalene via various pathways in chemostat culture // **Applied Microbiology and Biotechnology**. 1997. V. 48. N 4.P. 493–498.
5. Балашова Н.В. Кошелева И.А., Филонов А.Е., Гаязов Р.Р., Боронин А.М. Штамм *Pseudomonas putida* BS3701 — деструктор фенантрена и нафталина // **Микробиология**. 1997. Т. 66. № 4. С. 488–493.
6. Пунтус И.Ф., Филонов А.Е., Кошелева И.А., Гаязов Р.Р., Карпов А.В., Боронин А.М. Выделение и характеристика микроорганизмов–деструкторов полициклических ароматических углеводов // **Микробиология**. 1997. Т. 66. № 2. С. 269–272.
7. Кошелева И.А., Соколов С.Л., Балашова Н.В., Филонов А.Е., Мелешко Е.И., Гаязов Р.Р., Боронин А.М. Генетический контроль биodeградации нафталина штаммом *Pseudomonas* sp. 8909N // **Генетика**. 1997. Т. 33. № 6. С. 762–768.
8. Filonov A.E., Puntus I.F., Karpov A.V., Gaiazov R.R., Kosheleva I.A. and Boronin A.M. Growth and survival of *Pseudomonas putida* strains degrading naphthalene in soil model systems with different moisture levels // **Process Biochemistry**. 1999. V. 34. P. 303–308.
9. Filonov A.E., Karpov A.V., Kosheleva I.A., Puntus I.F., Balashova N.V., Boronin A.M. The efficiency of salicylate utilization by *Pseudomonas putida* strains catabolizing naphthalene via different biochemical pathways // **Process Biochemistry**. 2000. V. 35. P. 983–987.
10. Кошелева И.А., Балашова Н.В., Измалкова Т.Ю., Филонов А.Е., Соколов С.Л., Слепенькин А.В., Боронин А.М. Деградация фенантрена мутантными штаммами-деструкторами нафталина // **Микробиология**. 2000. Т. 69. № 6. С. 783–789.
11. Плотникова Е.Г., Алтынцева О.В., Кошелева И.А., Пунтус И.Ф., Филонов А.Е., Гавриш Е.Ю., Демаков В.А., Боронин А.М. Бактерии-деструкторы полициклических ароматических углеводов, выделенные из почв донных отложений района солеработок // **Микробиология**. 2001. Т. 70. № 1. С. 51–58.
12. Filonov A.E., Puntus I.F., Karpov A. V., Kosheleva I.A., Kashparov K.I., Slepkin A.V. and Boronin A.M. Efficiency of naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7 in soil // **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 2004. V. 79. P. 562–569.
13. Волкова О.В., Анохина Т.О., Пунтус И.Ф., Кочетков В.В., Филонов А.Е., Боронин А.М. Влияние плазмид биodeградации нафталина на физиологические характеристики ризосферных бактерий рода *Pseudomonas*. // **Прикладная биохимия и микробиология**. 2005. Т. 41. № 5. С. 525–529.

14. Puntus I.F., Sakharovsky V.G., Filonov A.E., Boronin A.M. Surface activity and metabolism of hydrocarbon-degrading microorganisms growing on hexadecane and naphthalene // **Process Biochemistry**. 2005. V. 40. N 8. P. 2643–2648.
15. Филонов А.Е., Ахметов Л.И., Пунтус И.Ф., Есикова Т.З., Гафаров А.Б., Измалкова Т.Ю., Соколов С.Л., Кошелева И.А., Боронин А.М. Конструирование и мониторинг маркированных плазмидосодержащих штаммов-деструкторов нафталина в почве // **Микробиология**. 2005. Т. 74. № 4. С. 526–532.
16. Соколов С.Л., Кошелева И.А., Филонов А.Е., Боронин А.М. Влияние транспозонов на экспрессию генов биодegradации нафталина у штамма *Pseudomonas putida* BS202 (NPL-1) и его производных // **Микробиология**. 2005. Т. 74. № 1. С. 79–86.
17. Игнатова А.А., Ветрова А.А., Лисов А.В., Филонов А.Е., Пунтус И.Ф., Боронин А.М. Динамика численности и взаимодействие псевдомонад, стимулирующих рост растений, и штаммов-деструкторов нафталина в ризосфере горчицы белой // **Биотехнология**. 2006. № 6. С. 35–43.
18. Нечаева И.А., Гафаров А.Б., Филонов А.Е., Пунтус И.Ф., Боронин А.М. Составление и отбор ассоциаций микроорганизмов, способных к деградации углеводородов нефти при пониженной температуре // **Известия Тульского государственного университета**. Серия Химия. 2006. Вып. 6. С. 124–130.
19. Anokhina T.O., Volkova O.V., Puntus I.F., Filonov A.E., Kochetkov V.V., Boronin A.M. Plant growth-promoting *Pseudomonas* bearing catabolic plasmids: naphthalene degradation and effect on plants // **Process Biochemistry**. 2006. V. 41. N 12. P. 2417–2423.
20. Ахметов Л.И., Иванова Е.С., Пунтус И.Ф., Есикова Т.З., Филонов А.Е., Шкидченко А.Н., Боронин А.М. Горизонтальный перенос плазмиды биодegradации нафталина в процессе микробной деструкции дизельного топлива и нефти в открытом проточном биореакторе // **Биотехнология**. 2006. № 4. С. 79–86.
21. Пырченкова И.А., Гафаров А.Б., Пунтус И.Ф., Филонов А.Е., Боронин А.М. Выбор и характеристика активных психротрофных микроорганизмов-деструкторов нефти // **Прикладная биохимия и микробиология**. 2006. Т. 42. № 3. С. 298–305.
22. Гафаров А.Б., Панов А.В., Филонов А.Е., Боронин А.М. Изменение состава сообщества бактерий-деструкторов ароматических соединений в нефтешламах в процессе их обезвреживания в проточном биореакторе // **Прикладная биохимия и микробиология**. 2006. Т. 42. № 2. С. 180–186.
23. Filonov A.E., Puntus I.F., Karpov A.V., Kosheleva I.A., Akhmetov L.I., Yonge D., Petersen J., Boronin A.M. Assessment of naphthalene biodegradation efficiency provided by microorganisms of genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* in soil model systems // **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 2006. V. 81. N. 2. P. 216–224.
24. Ветрова А.А., Нечаева И.А., Игнатова А.А., Пунтус И.Ф., Аринбасаров М.У., Филонов А.Е., Боронин А.М. Влияние катаболических плазмид на физиологические параметры бактерий рода *Pseudomonas* и эффективность биодеструкции нефти // **Микробиология**. 2007. Т. 76. № 3. С. 354–360.
25. Filonov A.E., Nechaeva I.A., Akhmetov L.I., Gafarov A.B., Puntus I.F., Boronin A.M. Biodegradation of crude oil by introduced psychrotrophic and indigenous microbial association under laboratory and field conditions in soils of Moscow region, Russia // **Proceeding of the Thirtieth Arctic and Marine Oilspill Program (AMOP) Technical Seminar**. June 5–7, 2007, Edmonton, Canada. V. 1. P. 319–329.

26. Филонов А.Е., Нечаева И.А., Гафаров А.Б., Аринбасаров М.У., Пунтус И.Ф., Суни С., Романчук М., Боронин А.М. Биодegradация нефти психротрофными микроорганизмами-деструкторами и её адсорбция растительным сорбентом в жидкой минеральной среде // **Биотехнология**. 2007. № 2. С. 31–39.
27. Ветрова А.А., Игнатова А.А., Филонов А.Е., Пунтус И.Ф., Боронин А.М. Деструкция нефти бактериями рода *Pseudomonas*, содержащими различные плазмиды биодegradации // **Известия Тульского государственного университета**. Естественные науки. 2008. Вып. 2. С. 186–193.
28. Петриков К.В., Власова Е.П., Понаморёва О.Н., Алферов В.А., Якшина Т.В., Нечаева И.А., Ахметов Л.И., Пунтус И.Ф., Самойленко В.А., Филонов А.Е. Сохранение жизнеспособности и деградативной активности микроорганизмов-нефтедеструкторов при различных способах хранения биомассы // **Известия Тульского государственного университета**. Естественные науки. 2008. Вып. 2. С. 226 – 237.
29. Филонов А.Е., Петриков К.В., Якшина Т.В., Пунтус И.Ф., Власова Е.П., Нечаева И.А., Самойленко В.А. Режимы раздельного и совместного культивирования микроорганизмов-деструкторов нефти родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* // **Биотехнология**. 2008. № 6. С. 80–85.
30. Овчинникова А.А., Ветрова А.А., Филонов А.Е., Боронин А.М. Взаимодействие штаммов-деструкторов полициклических ароматических углеводородов: колонизация корней и защита растений от токсического действия фенантрена // **Известия Тульского государственного университета**. Естественные науки. 2008. Вып. 1. С. 211–220.
31. Пунтус И.Ф., Филонов А.Е., Ахметов Л.И., Карпов А.В., Боронин А.М. Дegradация фенантрена бактериями родов *Pseudomonas* и *Burkholderia* в модельной почве // **Микробиология**. 2008. Т. 77. № 1. С. 11–20.
32. Ахметов Л.И., Филонов А.Е., Пунтус И.Ф., Кошелева И.А., Нечаева И.А., Йонге Д., Петерсен Дж., Боронин А.М. Горизонтальный перенос катаболических плазмид в процессе биодegradации нафталина в модельной почве. // **Микробиология**, 2008, Т. 77. №1. С. 29–39.
33. Овчинникова А.А., Ветрова А.А., Филонов А.Е., Боронин А.М. Биодegradация фенантрена и взаимодействие *Pseudomonas putida* BS3701 и *Burkholderia* sp. BS3702 в ризосфере растений // **Микробиология**. 2009. Т. 78. № 4. С. 484–490.
34. Ветрова А.А., Овчинникова А.А., Пунтус И.Ф., Филонов А.Е., Боронин А.М. Интенсификация биодegradации нефти плазмидосодержащими штаммами *Pseudomonas* в модельных почвенных системах // **Биотехнология**. 2009. № 4. С. 82–90.
35. Нечаева И.А., Филонов А.Е., Ахметов Л.И., Пунтус И.Ф., Боронин А.М. Стимуляция микробной деструкции нефти в почве путём внесения бактериальной ассоциации и минерального удобрения в лабораторных и полевых условиях // **Биотехнология**. 2009. № 1. С. 64–70.
36. Филонов А.Е., Ахметов Л.И., Пунтус И.Ф., Есикова Т.З., Гафаров А.Б., Кошелева И.А., Боронин А.М. Горизонтальный перенос катаболических плазмид и биодegradация нафталина в открытой почве // **Микробиология**. 2010. Т. 79. № 2. С. 206–212.
37. Петриков К.В., Власова Е.П., Ветрова А.А., Овчинникова А.А., Понаморёва О.Н., Алферов В.А., Пунтус И.Ф., Филонов А.Е. Получение сухой формы биопрепарата для очистки от нефтяных загрязнений и изучение его свойств при долговременном хранении // **Известия Тульского государственного университета**. Естественные науки. 2010. Вып. 1. С. 186–195.
38. Petrikov K., Delegan Ya., Surin A., Ponomoreva O., Puntus I., Filonov A., Boronin A. Glycolipids of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* oil-degrading bacteria used in bioremediation preparations: Formation and structure // **Process Biochemistry**. 2013. V. 48. Is. 5-6. P. 931–935.

39. Ветрова А.А., Иванова А.А., Филонов А.Е., Забелин В.А., Нечаева И.А., Нгуэт Ле Тхи Бич, Боронин А.М. Сравнительная эффективность деградации нефтепродуктов консорциумом плазмидосодержащих штаммов-деструкторов и биопрепаратами «МикроБак», «Биоойл». **Известия Тульского государственного университета. Естественные науки.** 2013. Вып. 2. Ч.1. С. 258–272.
40. Ветрова А.А., Иванова А.А., Филонов А.Е., Забелин В.А., Гафаров А.Б., Соколов С.Л., Нечаева И.А., Пунтус И.Ф., Боронин А.М. Биодеструкция нефти отдельными штаммами и принципы составления микробных консорциумов для очистки окружающей среды от углеводородов нефти. **Известия Тульского государственного университета.** 2013. Вып. 2. Ч. 1. С. 241–257.
41. Зякун А.М., Бродский Е.С., Баскунов Б.П., Захарченко В.Н., Пешенко В.П., Филонов А.Е., Ветрова А.А., Иванова А.А., Боронин А. М. Биоремедиация почв, загрязненных нефтью: использование [13с]/[12с] отношений для характеристики микробных продуктов при биодegradации углеводородов нефти. **Прикладная биохимия и микробиология.** 2014. Т. 50. № 5. С. 497-507.
42. Semenyuk N.N., Yatsenko V.S., Strijakova E.R., Filonov A.E., Petrikov K.V., Zavgorodnyaya Yu.A., Vasilyeva G.K. Effect of activated charcoal on bioremediation of diesel fuel contaminated soil // **Microbiology.** 2014. V. 83. No 5. P. 589-598.
43. Иванова А.А., Ветрова А.А., Филонов А.Е., Боронин А.М. Биодegradация нефти микробно-растительными ассоциациями. **Прикладная биохимия и микробиология.** 2015. Т. 51. № 2. С. 191-197.

#### **Обзоры и главы в научных книгах**

44. Филонов А.Е., Боронин А.М. Стабильность плазмид и конкуренция плазмидосодержащих и бесплазмидных штаммов в условиях непрерывного культивирования // **Антибиотики и химиотерапия.** 1990. Т. 35. № 5. С.46–50.
45. Boronin A.M., Kuzmin N.P., Starovoytov I.I., Kosheleva I.A. Filonov A.E., Gaiazov R.R., Karpov A.V., Sokolov S.L. Environmental biotechnology issues in Russia / In: **Environmental Science Research. V. 54: Biotechnology in the Sustainable Environment.** Ed. by Sayler G.S., Sanseverino J., Davis K.L. New York and London: Plenum Press, 1997. P. 153–168.
46. Boronin A.M., Filonov A.E., Kosheleva I.A., Shkidchenko A.N., Gafarov A.B., Sokolov S.L., Puntus I.F., Grishchenkov V.G., Dmitriev V.V., Arinbasarov M.U. Bioremediation of land oil spills: diversity of microorganisms degrading oil hydrocarbons / In: **Oil and Hydrocarbon Spills III: Modeling, Analysis and Control.** Ed. by C.A. Brebbia. Boston: WIT Press, Southampton, Boston, UK, 2002. P. 169–177.
47. Boronin A.M., Filonov A.E., Kosheleva I.A., Shkidchenko A.N., Puntus I.F. and Arinbasarov M.U. Microorganisms for bioremediation of oil contaminated sites / In: Proceedings of the First International Congress on **Petroleum Contaminated Soils, Sediments and Water: Analysis, Assessment and Remediation.** Volume I, Ed. by P. KostECKI, M. Behbehani, C. Langlois, Amherst Scientific Publishers, Amherst, Massachusetts, USA, 2004. P. 35-43.
48. Filonov A., Ovchinnikova A., Vetrova A., Puntus I., Nechaeva I., Petrikov K., Vlasova E., Akhmetov L., Shestopalov A., Zabelin V., Boronin A. Oil-spill bioremediation, using a commercial biopreparation “MicroBak” and a consortium of plasmid-bearing strains “V&O” with associated plants / In: **Introduction to Enhanced Oil Recovery (EOR) Processes and Bioremediation of Oil-Contaminated Sites** / Ed. by Dr. Laura Romero-Zerón. Rijeka: InTech, 2012. P. 291–318.

49. Ахметов Л.И., Пунтус И.Ф., Филонов А.Е., Боронин А.М. Воздушные выбросы при нефтедобыче и нефтепереработке и перспективы применения биотехнологических способов их обезвреживания // **Нефтехимия и нефтепереработка**. 2014. №2. С. 39-45.

#### **Патенты на изобретения**

50. Филонов А.Е., Кошелева И.А., Шкидченко А.Н., Пырченкова И.А., Пунтус И.Ф., Гафаров А.Б., Боронин А.М. Ассоциация штаммов бактерий, продуцирующих биоэмульгаторы, для деградации нефти и нефтепродуктов в почвах, пресной и морской воде. Патент Российской Федерации №2312891. Приоритет изобретения 10.03.2006. Оpubл. 20.12.2007. Бюл. № 35.

51. Филонов А.Е., Кошелева И.А., Пунтус И.А., Ахметов Л.И., Боронин А.М. Штамм бактерий *Pseudomonas putida*, продуцирующий поверхностно-активные вещества, для деградации полициклических ароматических углеводородов и углеводородов нефти. Патент Российской Федерации № 2344170. Приоритет 10.03.2006. Оpubл. 20.01.2009. Бюл. № 2.

52. Филонов А.Е., Кошелева И.А., Самойленко В.А., Шкидченко А.Н., Нечаева И.А., Пунтус И.Ф., Гафаров А.Б., Якшина Т.В., Боронин А.М., Петриков К.В. Биопрепарат для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами, способ его получения и применения. Патент Российской Федерации №2378060. Приоритет изобретения 05.07.2007. Оpubл. 10.01.2010. Бюл. № 1.

53. Петриков К.В., Овчинникова А.А., Ветрова А.А., Понаморева О.Н., Филонов А.Е., Пунтус И.Ф., Самойленко В.А., Якшина Т.В., Боронин А.М. Способ получения сухой формы биопрепарата для очистки территорий от загрязнений нефтью и нефтепродуктами. Патент Российской Федерации № 2434059. Приоритет 27.05.2010. Оpubл. 20.11.2011. Бюл. № 32.

54. Филонов А.Е., Ветрова А.А., Иванова А.А., Петриков К.В., Пунтус И.Ф., Боронин А.М. Способ активации сухой формы биопрепарата для очистки нефтезагрязненных грунтов. Патент Российской Федерации № 2538404. Приоритет 09.08.2013. Оpubл. 10.01.2015. Бюл. № 1.

#### **Статьи в научных сборниках и других изданиях**

55. Boronin A.M., Kosheleva I.A., Filonov A.E., Sokolov S.L., Karpov A.V. and Grischenkov V.G. Microorganisms for bioremediation: Bacterial strains evaluation // Bioprocess Engineering Research Center's International Symposium' 95. Seoul, Korea. 1995. P. 89–98.

56. Пунтус И.Ф., Ахметов Л.И., Филонов А.Е., Нечаева И.А., Рогова Т.В. Учебно-методическое пособие по курсу «Генетические методы биотехнологии защиты окружающей среды» / Тула: Издательство ТулГУ, 2008. 113 с.

57. Filonov A., Nechaeva I., Vetrova A., Ovchinnikova A., Gafarov A., Puntus I., Akhmetov L. Psychrotrophic microorganisms and catabolic plasmids for oil spills bioremediation // ISTC Workshop at the International Conference on Contamination Soil. Milan, Italy, 3–6 June. 2008. P. 61–69.