РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН

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)

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Пущино — 2016

ВВЕДЕНИЕ **10**
Актуальность **10**
Цель и задачи исследования **11**
Научная новизна **12**
Научно-практическая значимость работы **13**
Апробация работы **15**
Связь работы с крупными научными программами и грантами **16**
Личный вклад автора **16**
Публикации **16**
Структура и объем диссертации **16**
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ **17**
Биодеградация углеводородов нефти, методы и биопрепараты для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений **17**
Глава 1. Деградация углеводородов нефти **17**
1.1 Нефть как источник загрязнений окружающей среды **17**
1.2 Абиотическая деструкция нефти **19**
1.3 Микробная деградация нефти **20**
Глава 2. Плазмиды биодеградации **29**
2.1. Плазмиды биодеградации парафинов и циклопарафинов **30**
2.2. Плазмиды биодеградации ароматических углеводородов **32**
2.3. Мобильные генетические элементы в составе плазмид **37**
2.4 Роль катаболических плазмид в деградации углеводородов нефти **41**
Глава 3. Распространение катаболических плазмид в природе **43**
3.1.Конъюгационный перенос катаболических плазмид и трансформация **43**
3.2 Мониторинг бактериальных штаммов (доноров, реципиентов и трансконъюгантов) и процесса переноса катаболических плазмид **53**
3.3 Факторы, влияющие на перенос катаболических плазмид и деградацию поллютантов **57**
Глава 4. Хемотаксически активные микроорганизмы-деструкторы **63**
Глава 5. Виды и особенности синтеза биологических поверхностно-активных веществ **69**
5.1 Классификация биологических поверхностно-активных веществ **69**
5.2 Особенности строения и синтеза рамнолипидов и трегалолипидов **71**
Глава 6. Методы биоремедиации территорий, загрязнённых нефтью и нефтепродуктами **75**
6.1 Активация аборигенных микроорганизмов (биостимуляция) **77**

6.2 Интродукция микроорганизмов-деструкторов (биоаугментация)..... 83
Глава 7. Биопрепараты для очистки от нефтяных загрязнений: принципы разработки и применения 90
7.1 Разработка биопрепаратов 90
7.2 Применение биопрепаратов 94
7.3 Коммерческие препараты на основе углеводородокисляющих микроорганизмов для очистки почвенных и водных экосистем от нефти и нефтепродуктов..... 97
7.4 Проблема сохранения жизнеспособности микроорганизмов в составе биопрепаратов 102
Глава 8. Фиторемедиационные технологии..... 108
8.1 Фитоэкстракция 111
8.2 Ризофильтрация 111
8.3 Фитодеградация..... 112
8.4 Фитоволатилизация..... 113
8.5 Фитогидравлика 113
8.6 Ризодеградация 114
8.7 Роль микроорганизмов в процессе фиторемедиации загрязненной окружающей среды..... 115
8.8 Популяционные взаимодействия микроорганизмов 117
8.9 Растительно-микробные взаимодействия..... 117
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ..... 120
2.1. Бактериальные штаммы 120
2.1.1. Питательные среды, источники углерода и энергии, антибиотики 120
2.1.2. Условия культивирования..... 122
2.2. Определение эффективности очистки нефтезагрязненных систем 123
2.3. Световая микроскопия……...125
2.4. Электронно-микроскопические методы……126
2.5. Статистическая обработка результатов……126
2.6. Элиминация бактериальных плазмид 126
2.7. Коньюгационный перенос бактериальных плазмид..... 127
2.8. Трансформация клеток *E.coli* плазмидной ДНК……..127
2.9. Определение стабильности признаков утилизации нафталина и салицилата..127
2.10. Выделение тотальной ДНК микроорганизмов..... 128
2.11. Выделение плазмидной ДНК..... 128
2.12. Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции 129
2.13. Полимеразная цепная реакция..... 129
2.14. RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) анализ..... 130
2.15. Разделение амплифицированных фрагментов ДНК. 131

2.16. Электрофорез в агарозном геле 131
2.17. Определение активностей ключевых ферментов деградации нафталина……131
2.18. Определение концентрации белка ……132
2.19. Измерение индекса эмульгирования 132
2.20. Измерение эмульгирующей активности 133
2.21. Измерение поверхностного натяжения 133
2.22. Измерение содержания гликолипидных биоПАВ 133
2.23. Очистка биоПАВ методом колоночной хроматографии 134
2.24. Тонкослойная хроматография гликолипидов 135
2.25. Анализ биоПАВ методом масс-спектрометрии 135
2.26. Анализ биоПАВ методом инфракрасной спектроскопии 135
2.27. Условия проведения периодического культивирования в ферментёре 135
2.28. Хранение микроорганизмов 136
2.29. Лиофилизация 137
2.30. Контактная сушка 137
2.31. Приготовление модельных почвенных систем 137
2.32.Внесение инокулята в почву в лабораторных модельных системах 138
2.33. Отбор проб для определения общей численности микроорганизмов и содержания нефти 138
2.34. Определение концентрации нафталина в почвенных экстрактах 138
2.35. Определение концентрации салицилата в культуральной жидкости 139
2.36. Мониторинг штаммов-деструкторов в процессе деградации нефти в модельных почвенных системах 139
2.37. Модельный полевой эксперимент с опытным образцом биопрепарата «МикроБак» 140
2.38. Полевые испытания опытного образца биопрепарата «МикроБак» 140
2.39. Гнотобиотическая система для выращивания растений 140
2.40. Полевые испытания растительно-микробной ассоциации «ВиО» — ячмень 141
3. РЕЗУЛЬТАТЫ 142
3.1 Изучение и характеристика активных микроорганизмов-деструкторов углеводороды нефти 142
3.1.1. Выбор и характеристика активных микроорганизмов, способных разлагать углеводороды нефти при пониженных температурах в присутствии соли 142
3.1.2 Выбор и характеристика микроорганизмов-нефтедеструкторов по способности к деградации высоких концентраций нефти при повышенных концентрациях морской соли и в широком температурном и pH-диапазонах 154
3.2. Влияние катаболических плазмид на биодеградацию углеводородов нефти…164

3.2.1. Биодеградация нефти бесплазмидными и плазмидосодержащими микроорганизмами – деструкторами полициклических ароматических углеводородов в жидкой минеральной среде 164
3.2.2. Биодеструкция нефти бесплазмидными бактериями и плазмидосодержащими штаммами-деструкторами моноциклических ароматических углеводородов в жидкой минеральной среде 169
3.2.3. Роль плазмид биодеградации нафталина, толуола и камфары в процессе биодеградация нефти в жидкой минеральной среде 176
3.2.4. Роль плазмид биодеградации ПАУ в процессе биодеградация нефти в модельных почвенных системах 181
3.3 Роль горизонтального переноса катаболических плазмид в процессе биодеградации ПАУ 185
3.3.1. Конструирование маркированных штаммов деструкторов *P. putida* KT2442(pNF142::Tc) и *P. putida* BS394(pNF142::Tc)……...185
3.3.2. Определение удельной скорости роста штаммов-деструкторов на нафталине……187
3.3.3. Горизонтальный перенос плазмид биодеградации нафталина в лабораторных условиях……..188
3.3.4 Горизонтальный перенос плазмид биодеградации нафталина в почве в открытой окружающей среде 200
3.4 Образование биологических ПАВ бактериями – эффективными нефтедеструкторами 205
3.4.1 Характеристика способности микроорганизмов-нефтедеструкторов к продуцированию биоПАВ 205
3.4.2 Выделение биоПАВ, продуцируемых микроорганизмами-нефтедеструкторами 209
3.4.3 Особенности структуры биоПАВ 215
3.5 Составление ассоциаций микроорганизмов, перспективных для использования в составе биопрепаратов 220
3.5.1 Составление и отбор ассоциаций микроорганизмов, способных к деградации углеводородов нефти при пониженной температуре 220
3.5.2 Составление ассоциации штаммов, способных к деградации высоких концентраций нефти в широком температурном и pH диапазонах 223
3.6 Сравнительная эффективность деструкции нефти и дизельного топлива опытными образцами биопрепаратов «МикроБак», «ВиО» и биопрепаратом «Биоойл» в жидкой минеральной среде 227

3.7 Сравнительная эффективность деструкции нефти опытными образцами биопрепаратов «МикроБак», «ВиО» и биопрепаратом «Биоойл» в лабораторном почвенном эксперименте..... 231
3.8 Раздельное и совместное культивирование микроорганизмов-нефтедеструкторов 234
3.9 Получение различных форм микробной биомассы и её хранение. 238
Сохранение жизнеспособности и деградативной активности микроорганизмов, входящих в состав биопрепаратов. 238
3.9.1 Кратковременное хранение микроорганизмов-нефтедеструкторов в жидкой форме 238
3.9.2. Длительное хранение микроорганизмов-нефтедеструкторов…….241
3.9.3 Новый способ получения сухой формы биопрепарата методом контактной сушки 245
3.10 Мониторинг интродуцированных в лабораторные модельные системы и открытую окружающую среду штаммов-нефтедеструкторов..... 247
3.11 Применение опытного образца биопрепарата «МикроБак» для биоремедиации почвы, загрязненной нефтью, в условиях полевого эксперимента..... 250
3.11.1. Изменение численности микробных популяций в почве..... 250
3.11.2. Мониторинг интродуцированной микробной ассоциации 252
3.11.3. Убыль нефти в полевом эксперименте 254
3.12 Полевые испытания опытного образца биопрепарата «МикроБак» по очистке грунта от загрязнений нефтью и нефтепродуктами на территории ОАО «Тульская Топливно-Энергетическая Компания»..... 256
3.13 Разработка растительно-микробных ассоциаций для биоремедиации нефтезагрязненных почв и оценка их эффективности при деградации нефти в стерильных модельных почвенных системах..... 259
3.13.1 Скрининг растений для составления эффективной растительно-микробной ассоциации..... 259
3.13.2 Влияние микроорганизмов, входящих в состав ассоциации «ВиО» на рост растений в условиях загрязнения почвы нефтью 261
3.13.3 Динамика численности интродуцированных штаммов-деструкторов углеводородов нефти 262
3.13.4 Деградация нефти микробно-растительными ассоциациями..... 265
3.14 Оценка эффективности деградации нефти в нестерильных модельных почвенных системах, содержащих растительно-микорбные ассоциации..... 265
3.14.1 Влияние микробной ассоциации «ВиО» на рост ячменя в условиях загрязнения почвы нефтью 265

3.14.2 Динамика численности микроорганизмов в составе растительно-микробных ассоциаций в ризосфере и ризоплане растений 267
3.14.3 Убыль нефти при использовании растительно-микробной ассоциации в нестерильных модельных системах 268
3.15 Полевые испытания растительно-микробной ассоциацией «ВиО» — ячмень и коммерческих биопрепаратов ЗАО «Биоойл»в условиях реального разлива нефти 268
3.15.1 Влияние биопрепаратов «ВиО» «Биоойл-СН» и «Биоойл-Югра» на рост ячменя в условиях реального разлива нефти 269
3.15.2 Численность микроорганизмов-деструкторов в почве и на корнях ячменя в условиях реального разлива нефти 269
3.15.3 Степень деструкции нефти биопрепаратами «ВиО», «Биоойл-СН» и «Биоойл-Югра», ассоциированными с ячменем в условиях реального разлива нефти 271
3.16 Депонирование штаммов, изучение их патогенности, патенты и товарный знак 272
3.16.1. Депонирование штаммов 272
3.16.2 Изучение патогенности микроорганизмов 273
3.16.3 Патенты и товарный знак 273
3.16.4 Биопрепарат «МикроБак»: тосиколого-гигиеническая экспертиза, Технические условия, Экспертное заключение Роспотребнадзора и Сертификат соответствия 275
4. ОБСУЖДЕНИЕ 277
4.1 Изучение и характеристика активных микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти 277
4.1.1. Выбор и характеристика активных микроорганизмов, способных разлагать углеводороды нефти при пониженных температурах 277
4.1.2 Выбор и характеристика микроорганизмов-нефтедеструкторов по способности к деградации высоких концентраций нефти, при повышенных концентрациях морской соли и в широком диапазоне pH 284
4.2 Влияние катаболических плазмид на биодеградацию углеводородов нефти 287
4.3 Роль горизонтального переноса катаболических плазмид в процессе биодеградации ПАУ 290
4.3.1 Конструирование маркированных штаммов-деструкторов *P. putida* KT2442(pNF142::Tn*Mod*-OTc) и *P. putida* BS394(pNF142::Tn*Mod*-OTc) для изучения горизонтального переноса плазмид биодеградации нафталина 290
4.3.2 Горизонтальный перенос плазмид биодеградации нафталина в почве в лабораторных условиях 291

4.3.3 Горизонтальный перенос плазмид биодеградации нафталина в почве в открытой окружающей среде 296
4.4 Особенности образования биологических ПАВ, продуцируемых бактериями-эффективными нефтедестукторами 300
4.4.1 Способность микроорганизмов-нефтедеструкторов к продуцированию биоПАВ..... 300
4.4.2 Определение особенностей строения биосурфактантов 303
4.5 Составление и отбор ассоциаций микроорганизмов, перспективных для использования в составе биопрепаратов 305
4.5.1 Составление и отбор ассоциаций микроорганизмов, способных к деградации углеводородов нефти при пониженной температуре 306
4.5.2 Составление ассоциации штаммов, способных к деградации высоких концентраций нефти в широком температурном и pH диапазонах 309
4.6 Сравнительная эффективность деструкции нефти и дизельного топлива опытными образцами биопрепаратов «МикроБак», «ВиО» и биопрепаратом «Биоойл» в жидкой минеральной среде 312
4.7 Сравнительная эффективность деструкции нефти опытными образцами биопрепаратов «МикроБак», «ВиО» и биопрепаратом «Биоойл» в лабораторном почвенном эксперименте..... 314
4.8 Раздельное и совместное культивирование микроорганизмов-нефтедеструкторов 315
4.9 Получение различных форм микробной биомассы и её хранение. Сохранение жизнеспособности и деградативной активности микроорганизмов, входящих в состав биопрепаратов 319
4.10 Мониторинг интродуцированных в окружающую среду штаммов-нефтедеструкторов 331
4.11 Применение опытного образца биопрепарата «МикроБак» для биоремедиации почвы, загрязненной нефтью, в условиях полевого эксперимента..... 334
4.12 Полевые испытания опытного образца биопрепарата «МикроБак» по очистке грунта от загрязнений нефтью и нефтепродуктами на территории ОАО «Тульская Топливно-Энергетическая Компания»..... 338
4.13 Разработка растительно-микробных ассоциаций для биоремедиации нефтезагрязненных почв и оценка их эффективности при деградации нефти в стерильных модельных почвенных системах..... 339
4.14 Оценка эффективности деградации нефти в нестерильных модельных почвенных системах, содержащих растительно-микробные ассоциации..... 342

4.15 Полевые испытания растительно-микробной ассоциацией «ВиО» — ячмень и коммерческих биопрепаратов ЗАО «Биоойл»в условиях реального разлива нефти 343
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 345
ВЫВОДЫ 351
СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ 353
Экспериментальные статьи в рецензируемых журналах 353
Обзоры и главы в научных книгах..... 357
Изобретения и патенты 3578
Статьи в научных сборниках и других изданиях 359
Литература..... 360

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами в настоящее время является глобальной проблемой (Vogt and Richnow, 2013). По степени вредного влияния на экосистемы нефть и нефтепродукты занимают второе место после радиоактивного загрязнения (Экологические проблемы…, 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 серьёзную опасность, как для экосистем, так и для здоровья человека (Xue et al., 2015). Следствием нефтяных разливов являются экологические катастрофы во всем мире (Wang et al., 2011). При этом самоочищение почв 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 and 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 трансформации или деградации углеводородов нефти хорошо 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 территорий и акваторий от нефти и нефтепродуктов используются биопрепараты, которые содержат жизнеспособные клетки как отдельных штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов («Путидойл», «Дизойл», «Биодеструктор», «Микромицет», «Бациспецин»), 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, узкий диапазон pH и температур; часто отсутствуют важные данные о способности микроорганизмов продуцировать биоэмульгаторы, об

эффективности деградации высоких концентраций нефти и нефтепродуктов; о наличии катаболических плазмид в клетках микроорганизмов-нефтедеструкторов.

В России большинство месторождений нефти и нефтезагрязненных 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 биодеградации и биоремедиации, а также разработка эффективных биопрепаратов и технологий очитки от нефтяных загрязнений в условиях холодного и умеренного климата.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось исследование биодеградации углеводородов 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 углеводородов нефти, обладающих способностью к деградации высоких концентраций нефти и нефтепродуктов в присутствии соли в широком температурном и pH диапазонах; а также образующих биоэмульгаторы;

2) изучить роль плазмид биодеградации в деструкции углеводородов 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 нефти и нефтепродуктов 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 чл.-корр. РАН А.М. Боронина о возможности применения плазмид в экологической биотехнологии разработана концепция выбора штаммов-нефтедеструкторов для составления микробных ассоциаций как основы биопрепаратов для биоремедиации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами в условиях умеренного и холодного климата. Углеводородокисляющие микроорганизмы в составе ассоциации должны быть совместимы, способны к деградации высоких концентраций нефти (до 30%) в широком температурном диапазоне (от 4 до 42°С), 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 ПАУ pAP4, pAP5, pAP35, pAP36, pBS3950. Полученные результаты показывают, что штаммы, содержащие конъюгативные плазмиды биодеградации ПАУ, интенсифицируют процессы очистки, повышают численность и биодеградативный потенциал микробных популяций нефтезагрязненных сайтов. Важным аспектом катаболического потенциала микроорганизмов в процессе деструкции нефти является комбинация «бактериальный хозяин — плазмида».

Разработан метод мониторинга интродуцированных в почву штаммов-деструкторов родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas*. На основании культурально-морфологических признаков, маркеров антибиотикорезистентности и с использованием 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 сукциноилтрегалолипиды.

Показана возможность глубинного периодического культивирования микроорганизмов-нефтедеструкторов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* в смешанной культуре с высоким выходом биомассы (с численностью родококков $3{,}8\times10^{10}$ КОЕ/г и псевдомонад – $3{,}4\times10^{10}$ 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 pH от 6 до 8 при пониженных и умеренных температурах (4–32°С). 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 этого микробного консорциума способны к деградации углеводородов нефти при концентрации до 30% в температурном диапазоне 4–42°С в присутствии до 5% соли при pH от 4 до 10.

Выявлены наиболее устойчивые к нефтезагрязнению растения: газонная трава и ячмень, которые были 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 важных

для эффективной деградации углеводородов 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°С);

— способность к деградации углеводородов при различных значениях pH (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 бензоата и глутамата натрия на клетки микроорганизмов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* позволяет повысить их выживаемость 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 увеличении скорости 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% в течение периода с июня по август 2008 г., что превысило показатели, полученные при использовании биопрепаратов ЗАО «Биоойл» (60–70%).

Получены положительные заключения ЗАО «Биоойл» и ООО «Газпромнефть-Ноябрьскнефтегаз» об эффективности деградации нефти ассоциацией «ВиО» в полевых испытаниях. Кроме того, эффективность деградации нефти и нефтепродуктов 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 нефтяных загрязнений, способ его получения и применения, а так же на способ получения сухой формы биопрепарата и способ активации сухой формы биопрепарата.

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" (Пущино, 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); 12th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium (Biosorption and Bioremediation III) (Прага, Чешская Республика, 2002); 1st 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); 13th 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); 4th Moscow International Congress "Biotechnology: State of the Art and Prospects of Development" (Москва, Россия, 2007); 30th Arctic and Marine Oil Spill Program (AMOP) Technical Seminar (Эдмонтон, Канада, 2007); III 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 Internetional Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (Стамбул, Турция, 2008); 5th international conference "Science and Training for Biosafety" (Пущино, Россия, 2008); Международная школа-конференция, посвященная 40-летию создания ГосНИИгенетика (Москва — Пущино, Россия, 2008); 3rd 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); 8th 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, проведённых 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, интерпретации, анализе и обобщении экспериментальных результатов, подготовке научных публикаций. 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», «Заключение», «Выводы», «Список основных публикаций автора по теме диссертации», «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.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Биодеградация углеводородов нефти, методы и биопрепараты для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений

Глава 1. Деградация углеводородов нефти

1.1 Нефть как источник загрязнений окружающей среды

Нефть и нефтепродукты оказывают непрерывно возрастающее влияние на биосферу нашей планеты в мировом масштабе (Wang et al., 2011; http://www.ecoportal.ru/; Huang, 2005; Castaldi, 2003; Квасников, Клюшникова, 1981). В настоящее время нефть является самым распространённым и востребованным источником энергии в мире. Вследствие несовершенства технологий ее добычи, транспортировки и переработки нефть одновременно является самым распространенным загрязнителем территорий и акваторий в мировом масштабе. Согласно экспертным оценкам ежегодные потери нефти превышают 45 млн. тонн, что составляет приблизительно 2% от ее мировой добычи, из них 22 млн. тонн загрязняют сушу. (Рогозина и др., 2010). Поэтому проблема очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений является одной из самых актуальных. Токсический эффект нефти и нефтепродуктов по отношению ко всем формам жизни известен давно и обычно объясняется разжижением липидного слоя цитоплазматической мембраны в присутствии нефти (Калюжный, 2001). Поэтому нефть должна рассматриваться как один из наиболее опасных загрязнителей окружающей среды из-за её высокой токсичности и огромных масштабов попадания в биосферу. По степени вредного влияния нефть, нефтепродукты и нефтесодержащие отходы занимают второе место после радиоактивного загрязнения (Экологические проблемы…, 2007).

Если в 80-е годы прошлого века ежегодное антропогенное поступление нефти в воды мирового океана составляло 12-15 млн. т. (Стадницкий, 1988), в начале 21 века оно оценивается в 7 – 8 млн. т (Шапоренко, 2007), при этом примерно 1/3 его поверхности постоянно или временно покрыта нефтяной пленкой. До 30%

загрязнений вод нефтью приходится на бытовые и промышленные отходы, 27% - на суда, 12% - на аварии танкеров и нефтяных платформ, но в то же время 24% загрязнений Мирового океана поступает со дна из естественных источников (http://www.ecoportal.ru). Таким образом, нефтезагрязнение не является чисто антропогенным, что обусловливает наличие в биосфере организмов, способных к росту и жизнедеятельности в загрязнённых нефтью средах.

Загрязнение почв нефтью, в отличие от загрязнения океана, по своим масштабам не является глобальным, а имеет локальный характер и поэтому изучено хуже (Шкидченко, 2001; Пиковский, 2003). Нефтяное загрязнение приводит к негативным изменениям в биоценозе почв (Поконова, 2003; Штина, Некрасова, 1988), а также к коренным изменениям в химическом составе, структуре и свойствах почв (Гайнутдинов с соавт., 1988; Коломынцева с соавт., 2005), резкому снижению продуктивности и ухудшению хозяйственной ценности земель. В нефтезагрязненной почве изменяется структура микробного сообщества (Киреева, 1996; Chaillan, 2006; Escalante-Espinosa, 2005; Jirasripongpun, 2002), подавляется фотосинтетическая активность высших растений (Бородавкин, 1981; Бузмаков, Ладыгин, 1993; Хабибуллин, Коваленко, 1982; Шилова, 1988). В результате разливов нефти почвы могут превращаться в типичные техногенные пустыни, в которых практически полностью подавлена жизнедеятельность биоты.

В России основные месторождения нефти и газа находятся в Западной Сибири и на Севере Европейской части страны. В результате интенсивной добычи и транспортировки аварии и масштабные разливы нефти стали обычным явлением. Примерно 7% всех функционирующих нефтяных месторождений в России имеет высокую загрязненность территории, 70% - слабую или среднюю. Хозяйственная деятельность топливно-энергетического комплекса Российской Федерации наносит огромный ущерб окружающей среде (Другов, Родин, 2007; Белонин, 1999).

В российском законодательстве в настоящее время отсутствует единый нормативный правовой акт, регламентирующий отношения в нефтегазовом секторе экономики. Одна из самых важных отраслей российской экономики регулируется преимущественно подзаконными нормативными правовыми актами. Насчитывается более сотни подзаконных нормативных актов федерального уровня, регулирующих отношения в нефтегазовом секторе экономики.

Сложившаяся на сегодняшний день в стране экологическая ситуация обуславливает все возрастающий спрос на создание современных технологий, обеспечивающих предотвращение и ликвидацию последствий разливов нефти и

нефтепродуктов в окружающую среду и диктует необходимость развития для этих целей рынка эффективных, мобильных и доступных по стоимости экологических услуг.

1.2 Абиотическая деструкция нефти

После попадания нефтепродуктов в окружающую среду уже в первые часы начинается процесс их деградации, в котором доминируют абиотические физико-химические процессы. Часть нефтепродуктов (бензин, керосин) может частично удаляться из среды путём выветривания. За первые 15 суток с верхнего слоя в летнее время может испариться около 30% нефтепродуктов, в основном, за счёт лёгких фракций (Другов и Родин, 2007). Компоненты нефти и нефтепродуктов на поверхности почв частично могут подвергаться фотоокислению. Абиотические факторы деструкции нефти существенно зависят от климатических особенностей различных географических зон.

Дизельное топливо и лёгкие масла мало выветриваются, но способны легко проникать в нижние слои почвы, в осадочные породы и грунтовые воды. Тяжёлые нефтепродукты, асфальтены практически не выветриваются и относительно медленно проникают вглубь почвы. Разлившаяся нефть и нефтепродукты адсорбируются почвой и в основной массе локализуются в её верхнем горизонте. Лишь небольшая часть углеводородов может проникать в подпочвенные слои, грунтовые воды. Это касается, главным образом, наиболее простых по строению низкомолекулярных парафиновых, нафтеновых и ароматических углеводородов нефти. Большую часть легкой фракции составляют алканы с числом углеродных атомов 5-10. Именно эта фракция нефти проявляет максимальную токсичность, но сравнительно легко удаляется за счет вымывания или испарения (Стабникова и др., 1996).

Среди абиотических механизмов деградации углеводородов нефти наряду с вымыванием и фотоокислением, наиболее значимым является испарение. Показано, что за первые сутки в летний период из нефтяного пятна на поверхности почвы испаряется до 80% технического бензина, 22% - керосина, 2-15% - сырой нефти и только 0,3% - летучих компонентов мазута (Изъюрова, 1950). Таким образом, существенное значение имеют физические характеристики видов нефти, загрязняющих окружающую среду; их летучесть и текучесть. Дальнейшее разрушение углеводородов нефти связано с процессом их биохимического окисления, которое происходит лишь при участии нефтеокисляющих микроорганизмов.

1.3 Микробная деградация нефти

Способность усваивать углеводороды нефти присуща микроорганизмам, относящимся к различным систематическим группам (Квасников, Ключникова, 1981). К ним относятся различные виды микромицетов, дрожжей и бактерий. Описано более 20 родов бактерий и более 10 родов грибов, способных к биодеградации различных нефтяных углеводородов (Барышникова, 2001). Часто окисление углеводородов происходит внутриклеточно посредством ферментов, индуцируемых углеводородным субстратом (Розанова, 1967, цит. по: Новоселова, 2004; Коронелли, 1980). В результате процесса биодеградации осуществляется разрушение, детоксикация, утилизация и минерализация углеводородов нефти (Черников и др., 2000).

Микроорганизмы-деструкторы углеводородов известны среди представителей следующих родов бактерий:

Acetobacterium (Watanabe et al., 2000, 2002),

Rhodococcus (Коронелли и др., 1994; Ягафарова и др., 1998; Чугунов и др., 2000; Куюкина и др., 2006; Whyte et al., 1998; Sharma, Pant, 2000; Dean-Ross et al., 2001; Margesin et al., 2003; Murygina et al., 2000, 2005),

Pseudomonas (Britton, 1984; Aislabie, 2000; Van Hamme, Ward, 2001; Rahman et al., 2002a; Piskonen et al., 2005),

Azotobacter (Коронелли и др., 1994; Градова и др, 2003),

Bacillus (Britton, 1984; Rahman et al., 2002b; Pineda-Flores et al., 2004; Toledo et al., 2006),

Arthrobacter (Логинов и др., 2004; Schwartz, Scow, 2001; Ionata et al., 2005),

Acinetobacter (Коронелли и др., 1994; Чугунов и др., 2000; Аушева, 2007; Hanson et al., 1997; Gallego et al., 2001; Marchal et al., 2003),

Sphingomonas (Aislabie, 2000; Baraniecki et al., 2002; Liu et al., 2004),

E. coli (Diaz et al., 2001),

Enterobacter (Toledo et al., 2006),

Cytophaga (Хомякова и др., 2003),

Corynebacterium (Ferrari et al., 1998; Rahman et al., 2002a; Pineda-Flores et al., 2004),

Mycobacterium (Marchal et al., 2003; Miller et al., 2004),

Flavobacterium (Ferrari et al., 1998; Rahman et al., 2002a),

Geobacillus (Bonch-Osmolovskaya et al., 2003),

Zooglea (Watanabe et al., 2000, 2002),

Achromobacter, *Alcanivorax* (Smits et al., 2002),

Alcaligenes, *Brevibacterium*, *Bukholderia*, *Gordonia* (Jirasripongpun, 2002),

Nocardia, *Thermoleophilum* (Van Beilen et al., 2003).

На основе анализа литературных данных можно сделать вывод, что наиболее распространенными в загрязненных нефтью местообитаниях являются бактерии, а именно представители родов *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* (Коронелли и др., 1994). К настоящему времени накоплен обширный материал о способности микроорганизмов утилизировать разнообразные углеводороды нефти. В то же время углеводороды обладают различной устойчивостью к микробной деструкции (Heath, 1997; Van Hamme et al., 2003).

1.3.1 Микробная деградация парафинов и циклопарафинов

Легкие *н*-алканы (до C_{16}) утилизируются микроорганизмами с заметно большей скоростью, чем изоалканы (Чугунов и др., 2000). Парафины могут служить единственным источником углерода и энергии для сапрофитных микобактерий и родственных им организмов, для ряда видов псевдомонад, нескольких родов дрожжей и некоторых грибов. Два фактора обуславливают микробиологическое окисление парафинов: наличие сложных ферментов – оксидаз смешанных функций (оксигеназ), осуществляющих введение одного атома кислорода из его молекулярной формы в концевую метильную группу углеводорода, и наличие в клетке структур, обеспечивающих поглощение гидрофобного и нерастворимого в воде субстрата, каким являются *н*-алканы. Обычно, ферменты, ответственные за окисление углеводородов, связаны с мембранными структурами клеток (Коронелли, 1982).

Биодеградация алканов может протекать по монотерминальному, дитерминальному и внутритерминальному путям. Так, например, Шарма с коллегами (Sharma and Pant, 2000) установили, что исследованные ими штаммы микроорганизмов рода *Rhodococcus* способны окислять алканы либо по монотерминальному и дитерминальному, либо только по внутритерминальному пути. При росте на нечетных *н*-алканах окисление происходит только по монотерминальному пути, а при росте на четных *н*-алканах - только по дитерминальному (Sharma and Pant, 2000).

Наиболее распространенный путь окисления *н*-алканов микроорганизмами включает три основных этапа:

1) первичное окисление н-алкана, приводящее к последовательному образованию соответствующего спирта, альдегида и, наконец, монокарбоновых кислот жирного ряда;

2) *бета*-окисление этих кислот с образованием в качестве основного промежуточного продукта ацетил-КоА;

3) окисление ацетата в цикле трикарбоновых кислот.

Микроорганизмы, усваивающие *н*-алканы, неспецифичны (за исключением метаноокисляющих), они распространены повсеместно и являются типичными представителями незагрязненных экосистем. Именно неспецифичностью парафинокисляющей микрофлоры объясняется высокая способность почвенных и водных биоценозов к самоочищению при загрязнении углеводородами этого типа.

Циклоалканы труднее поддаются микробиологическому разложению, по сравнению с алканами. В литературе описаны штаммы, способные деградировать циклические алканы. К ним относятся бактерии родов *Gordonia, Xanthobacter* и др. Штаммы, способные деградировать циклоалканы, имеют специфические ферментные системы, отличные от ферментных систем, использующихся микроорганизмами для окисления линейных алканов (Cheng et al., 2000, Tadashi et al., 2004). Рувьер и Чен (Rouviere and Chen, 2003), выделили бактериальный штамм, который был отнесён к группе *β*-протеобактерий – *Brachymonas petroleovorans* CHX и установили, что этот микроорганизм способен использовать циклогексан в качестве ростового субстрата. Брзостович и др. (Brzostowicz et al., 2005) идентифицировали два кластера генов в упомянутом штамме, которые участвуют в метаболизме циклогексана. Один кластер генов кодирует ферменты, вовлечённые в окисление циклогексана до циклогексанола. Белок, катализирующий эту реакцию, гомологичен бутан монооксигеназе. Второй большой кластер генов кодирует все ферменты, необходимые для окисления циклогексанола до адипата. Известны также штаммы *Acinetobacter* sp. NCIB 9871 и *Rhodococcus globerulus* CL1, которые растут на циклогексаноле (Rouviere and Chen, 2003). Этот факт является подтверждением того, что адипат в дальнейшем метаболизируется до диоксида углерода в процессе *β*-окисления (http://umbbd.msi.umn.edu).

1.3.2 Биодеградация ароматических углеводородов

Ароматические углеводороды являются наиболее опасной группой веществ с точки зрения воздействия на живые организмы. Несмотря на высокую токсичность ароматических углеводородов и их производных в природе существуют

микроорганизмы, способные использовать их в качестве источников углерода и энергии. Ароматические углеводороды утилизируются микроорганизмами до гидроксилированных производных с последующим разрывом бензольного кольца и образованием многочисленных утилизируемых субстратов. Последние деградируются до продуктов цикла Кребса через *орто*- и *мета*-расщепление (Зеленкова и др., 2003). Помимо бактерий родов *Pseudomonas, Aeromonas, Alcaligenes, Micrococcus, Beijerinckia, Nocardia, Vibrio, Flavobacterium* трансформировать ароматические соединения также способны грибы и цианобактерии (Sims et al., 1990).

1.3.2.1 Биодеградация моноциклических ароматических углеводородов

Метаболизм моноциклических ароматических углеводородов у микроорганизмов изучается на протяжении более 80 лет. Наиболее изучены пути деградации толуола. Впервые в 1928 г. Грей и Торнтон (Gray and Thornton, 1928) описали бактерию, способную расти на толуоле, используя его как единственный источник углерода. Штамм был идентифицирован как *Mycobacterium agreste*. В последующем грамположительные бактерии, участвующие в биодеградации моноароматических углеводородов, практически не изучались, и лишь в конце прошлого века снова стали изучать вклад данных микроорганизмов в деградацию толуола (Dabrock et al., 1994, Malachovsky et al., 1994, Warhurst et al., 1994).

На сегодняшний день известно пять путей деградации толуола (Рис. 1).

Показано, что бактериальная деградация моноциклических ароматических углеводородов начинается с атаки монооксигеназы или диоксигеназы ароматического кольца, либо с окисления метильной группы с последующей атакой ароматического кольца. Формирующиеся гидроксилированные ароматические углеводороды подвергаются расщеплению с разрывом ароматического кольца, образуя карбоксилированные соединения, которые при наличии в штамме ферментов дальнейшего окисления могут утилизироваться до интермедиатов цикла Кребса.

Наиболее полно изучен путь деградации толуола штаммом *Pseudomonas putida* mt-2. Деградация осуществляется посредством преобразования метильной группы в карбоксильную, и далее полученные метаболиты преобразуются в интермедиаты цикла Кребса с расщеплением катехола по *мета*-пути (Рис. 1, путь a).

Пути деградации толуола микроорганизмами *Burkholderia cepacia* G4 и P. pickettii PKO1 подобны пути tod, так как образуется второй промежуточный продукт деградации толуола – 3-метилкатехол (Рис. 1, путь d).

В штамме *P. mendocina* KR1 деградация толуола происходит по пути, который фактически объединяет пути tol и tod, т.к. происходит окисление метильной группы и прямое окисление ароматического кольца (Olsen et al., 1994, Smith, 1994, Worsey et al., 1975) (Рис. 1, путь e).

Известны пути микробной деградации *мета-* и *пара*-ксилолов, в которых метильная группа окисляется до карбоксильной, и далее полученные метаболиты преобразуются в интермедиаты цикла Кребса с расщеплением катехола по мета-пути (Рис. 1, пути b, c).

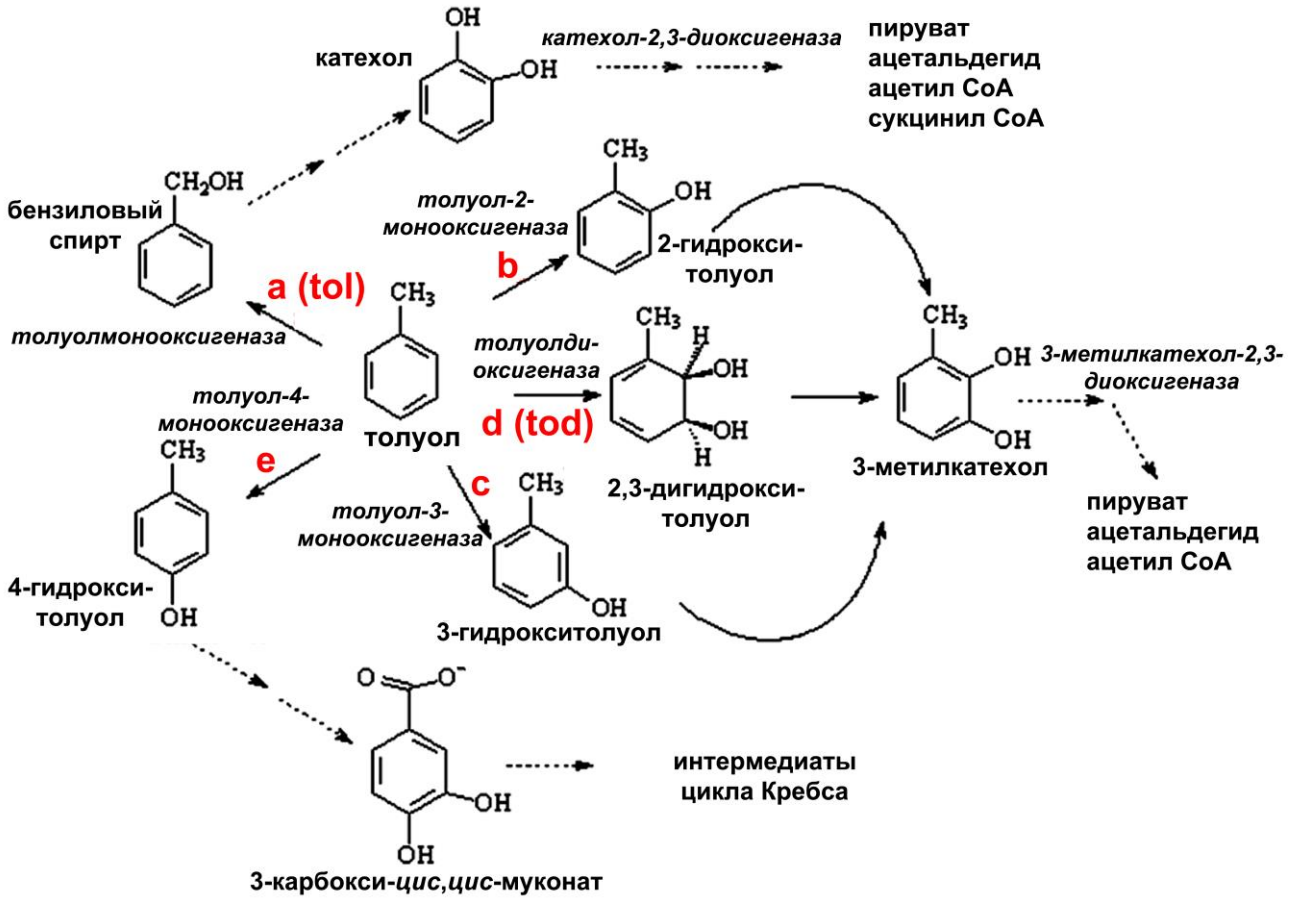


Рис. 1. Пути деградации толуола

Существование большого количества путей деградации моноароматических углеводородов возможно связано с конкурентными взаимоотношениями микроорганизмов и их адаптацией к изменяющимся условиям окружающей среды. В работе Дютца с соавторами (Duetz et al., 1994) было показано, что штамм *B. cepacia* G4, который деградирует толуол с участием фермента толуол-2-монооксигеназы, в условиях лимитирования по кислороду является наиболее конкурентоспособным по сравнению со штаммами, деградирующими толуол по другим путям. В условиях лимитирования по толуолу штамм *Pseudomonas mendocina* KR1, который деградирует

толуол с участием фермента толуол-4-монооксигеназы, наименее конкурентоспособен по сравнению с другими исследованными штаммами. В условиях лимитирования как по толуолу, так и по кислороду наименее конкурентоспособным был *P. putida* mt-2 (pWWO), который деградирует толуол с участием толуол монооксигеназы. Таким образом, первый из описанных путей биодеградации толуола оказался не самым оптимальным с точки зрения конкуренции микроорганизмов в специфических экологических нишах в условиях лимитирования по углероду.

1.3.2.2. Биодеградация полициклических ароматических углеводородов

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) являются одними из очень опасных загрязнителей, вследствие их токсичных, канцерогенных и мутагенных свойств, а также из-за их медленного разложения в природных условиях. Было показано, что главную роль в разложении полициклических ароматических углеводородов в окружающей среде играет микробная деградация (Sims et al., 1990). ПАУ могут полностью минерализоваться или только частично трансформироваться сообществами микроорганизмов или отдельными микробными штаммами (Cerniglia, 1984; Van Hamme et al., 2003).

Существуют фундаментальные различия в механизмах расщепления полициклических ароматических молекул, осуществляемых различными таксонами микроорганизмов. Бактерии и некоторые зеленые водоросли окисляют ПАУ, используя оба атома молекулярного кислорода (реакция катализируется диоксигеназой), при этом образуется *цис*-дигидродиол, который затем подвергается дегидрогенизации, образуя катехол. Некоторые грибы способны окислять ПАУ с помощью цитохрома Р-450 монооксигеназ посредством включения одного из атомов молекулы кислорода в ПАУ.

К настоящему времени известны общие принципы микробного метаболизма ПАУ:

1. Скорость деградации полициклических ароматических углеводородов обратно пропорциональна числу колец в молекуле ПАУ. Это связано с их низкой водной растворимостью, которая снижается с увеличением числа ароматических колец. Так, растворимость нафталина в воде при 25°С составляет 34 мг/л, фенантрена – 1,3 мг/л, однако даже в столь низких концентрациях он способен подвергаться микробиологической деструкции (Shuttleworth et al., 1996).

2. Механизмы биодеградации прокариот и эукариот требуют присутствия кислорода, инициирующего ферментативную атаку колец ПАУ (Поконова, 2003). Но

некоторые ферментативные системы, такие как метан монооксидазы и лигнин пероксидазы, участвуют в анаэробном разложении ПАУ (Leahy and Colwell, 1990).

3. Микробиологическая деградация низкомолекулярных ПАУ (нафталин, фенантрен, антрацен, бифенил), их биохимические пути и генетическая регуляция достаточно хорошо изучены. Но очень мало известно о микроорганизмах, способных утилизировать ПАУ с высокой молекулярной массой. Немного известно о генетических и регуляторных механизмах, включенных в бактериальный катаболизм таких ПАУ.

4. На микробную деградацию ПАУ в экосистемах влияют многие абиотические и биотические факторы, такие как температура, pH среды, тип почвы, доступность кислорода и воды, скорость диффузии в почву и в воду, микробная адаптация, питание, предварительное воздействие ксенобиотиков на микробную популяцию, биодоступность, концентрация, физические и химические свойства ПАУ (Sutherland et al., 1995).

В первичной атаке ПАУ часто участвуют ферменты с широкой субстратной специфичностью, например, ферменты биодеградации нафталина (Рис. 2). Первое прямое доказательство этого факта было дано Сансеверино с соавторами, которые показали, что гены, локализованные в 25 т.п.н. фрагменте, клонированные из плазмиды биодеградации нафталина NAH7, ответственны не только за деградацию нафталина, но и за трансформацию фенантрена и антрацена (Sanseverino et.al., 1993). В пользу этого говорит и тот факт, что многие штаммы-деструкторы наряду с нафталином способны деградировать и другие ПАУ. Например, был выделен штамм *Pseudomonas* XPW-2, обладающий способностью к росту на нафталине, бифениле, антрацене, фенантрене, хризене, пирене и *Pseudomonas* XPW-19, растущий на нафталине, фенантрене, хризене, пирене. Однако, теми же исследователями были изолированы штаммы, способные к росту только на нафталине (Zylstra et al., 1994). Энсли и Гибсон очистили терминальную оксигеназу нафталин диоксигеназы штамма PpG7, связывающую нафталин. Однако ни фенантрен, ни антрацен не являлись для нее альтернативными субстратами (Ensly et al.,1983).

Метаболическая последовательность и ферментативные реакции, ведущие к деградации нафталина, впервые были установлены в 1964 г. Дэвисом и Эвансоном (Davies et al., 1964). Известны четыре возможных пути катаболизма нафталина аэробными бактериями (Кочетков с соавт., 1985):

1) неполное окисление нафталина до салициловой кислоты, с высвобождением пирувата и накоплением салициловой кислоты в ростовой среде,

2) полный катаболизм нафталина с использованием мета-пути расщепления катехола, разрыв кольца между гидроксилированными и негидроксилированными атомами углерода. Продукты расщепления – полуальдегиды 2-гидроксимуконовой кислоты.

3) полный катаболизм нафталина с использованием орто-пути расщепления катехола, разрыв кольца происходит между двумя соседними гидроксилированными атомами углерода, что приводит к образованию дикарбоновой кислоты (цис,цис-муконата).

4) полный катаболизм нафталина через гентизиновую кислоту.

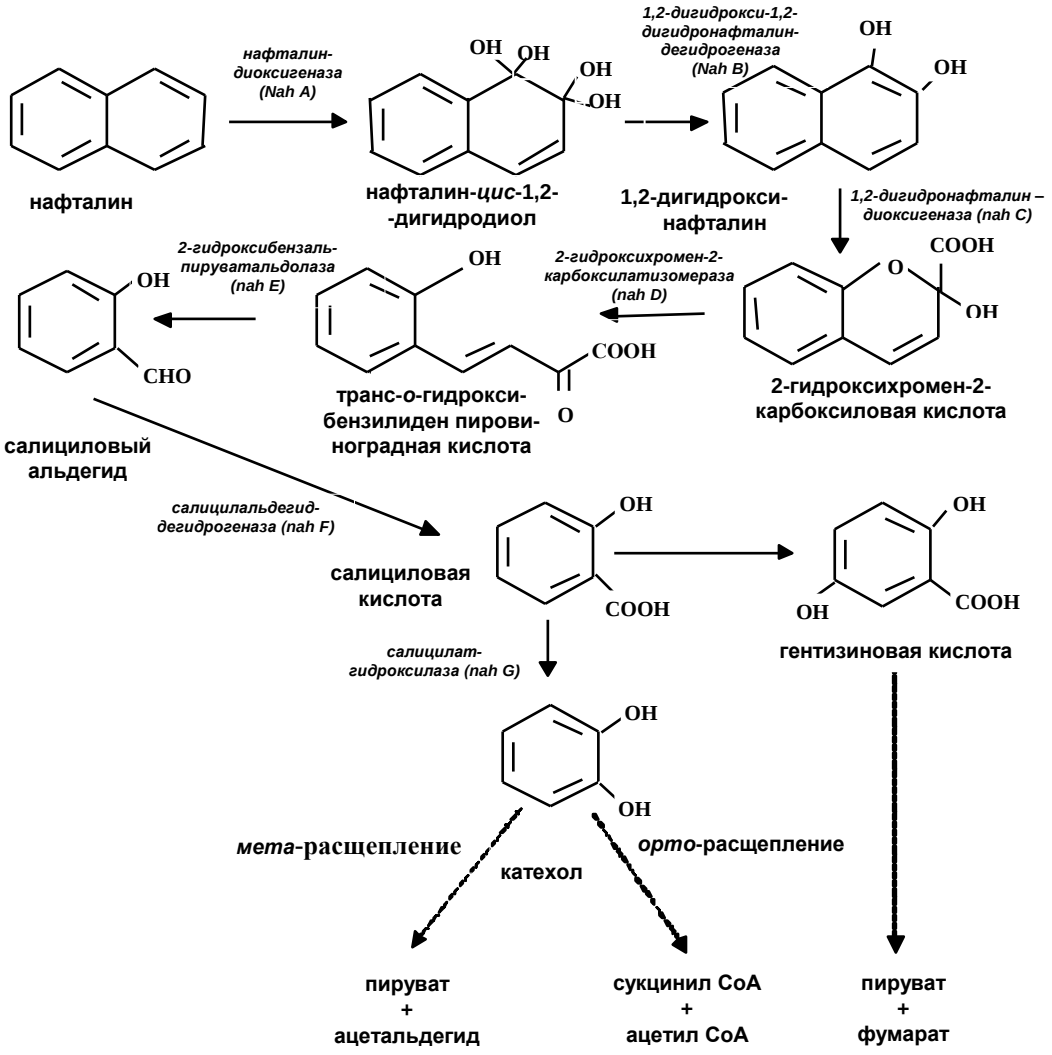


Рис. 2. Пути биодеградации нафталина

Показано, что бактериальная деградация ПАУ начинается с монооксигеназной или диоксигеназной атаки ароматического кольца. Формирующиеся

дигидроксилированные ПАУ подвергаются расщеплению с разрывом ароматического кольца, образуя карбоксилированные соединения, которые, при наличии в штамме ферментов дальнейшего окисления, могут утилизироваться до интермедиатов цикла Кребса (Sutherland et al., 1995, Zylstra et al., 1994).

1.3.3 Микробное окисление асфальтенов

Асфальтены являются фракцией нефтяного загрязнения, устойчивой к разложению микроорганизмами (Marin, 2005). Данный процесс происходит медленно, потому что молекулы асфальтенов являются сложными структурами, включающими парафины, ароматические циклы и гетероциклические углеводороды (Thouand et al., 1999). Это обуславливает их низкую доступность для микроорганизмов природных экосистем.

По данным А.А. Петрова, биодеградация асфальтенов сопровождается в основном окислением длинных парафиновых цепей (Петров, 1984). В работе Пинеды-Флореса (Pineda-Flores and Mesta-Howard, 2001) представлен возможный механизм биодеградации асфальтенов: фрагментация молекулы за счет фотоокисления; разрушение линейных составляющих; трансформация разветвленных алканов, гетеросоединений и ПАУ. Время деградации этих компонентов может варьировать от одной недели до 990 дней.

Несмотря на существующие пробелы в понимании механизмов биодеградации асфальтенов, в последнее время стали появляться работы, в которых представлены данные по снижению концентрации асфальтенов в модельных системах. Так, биодеградация асфальтенов показана как в лабораторных опытах с применением жидких сред и углеводородразрушающих бактерий, выделенных из нефтезагрязненных почв, так и непосредственно в полевых экспериментах при биоремедиации почв, загрязненных сырой нефтью (Chaillan et al., 2006). Возможность биодеградации асфальтенов демонстрирует применение ландфарминга (технологии основанной на использовании почвенных микроорганизмов и агротехнических приемов в аэробных экосистемах для снижения загрязнения через его трансформацию, иммобилизацию и детоксикацию). Совокупная убыль асфальтенов и смол при этом составила 85% в течение одного года (Mishra et al., 2001). В других работах описано повышение эффективности биодеградации асфальтенов в присутствии растений (Escalante-Espinosa, 2005; Huang et al., 2005).

Таким образом, к настоящему времени накоплен обширный материал о способности микроорганизмов утилизировать широкий круг углеводородов нефти,

который был представлен в данной главе. По степени снижения окисляемости микроорганизмами компоненты нефти и нефтепродуктов располагаются в следующей последовательности: н-алканы → разветвленные алканы → разветвленные алкены → низкомолекулярные н-алкил ароматические соединения → моноароматические соединения → полициклические ароматические углеводороды → асфальтены (Huesemann, 1995; Van Hamme et al., 2003). На сегодняшний день известно много работ, посвященных изучению генетическому контролю процессов биодеградации различных углеводородов, что демонстрирует повышенный интерес исследователей к пониманию механизмов биодеградации.

Глава 2. Плазмиды биодеградации

Основным генетическим элементом бактериальной клетки является бактериальная хромосома, организованная в виде репликона. Наряду с хромосомой в бактериальной клетке может присутствовать дополнительный генетический материал в виде плазмидной или фаговой ДНК. Плазмиды являются автономно реплицирующимися генетическими структурами (Брода, 1982) или, по исходному определению Джошуа Ледерберга, который ввел этот генетический термин в 1952 году, внехромосомными наследственными детерминантами (Lederberg, 1952). Плазмиды – репликоны, стабильно наследуемые, то есть сохраняющиеся без специальной селекции во внехромосомном состоянии (Боронин, 1983). Однако встречающиеся в природе плазмиды не являются для клеток прокариот абсолютно необходимыми (Leahy and Colwell, 1990).

Плазмиды представляют собой двухцепочечные кольцевые и линейные молекулы ДНК. Их размеры различны. Размер плазмид обычно варьирует от 0,85 т.п.н. (pRKU1 из *Thermotoga petrophila*) до 600 т.п.н., но у бруцелл и ризобий описаны мегаплазмиды размером более 1 млн.п.н, что иногда делает вопрос их дифференцировки от дополнительных хромосом риторическим (Norman, 2009).

Клетки псевдомонад часто содержат плазмиды с молекулярной массой от 3 до 500 т.п.н., в то время как молекулярная масса бактериальной хромосомы составляет 1000-10000 т.п.н. В клетках псевдомонад может содержаться несколько десятков копий мелких плазмид, тогда как число копий крупных (размером более 100 т.п.н.) составляет обычно одна-две на хромосому.

Плазмиды различаются по детерминируемым ими признакам, проявляемым бактериальными клетками-хозяевами. Известны плазмиды резистентности (R-плазмиды), несущие гены устойчивости к лекарственным препаратам, F-плазмиды или

половые факторы, Ti-плазмиды (tumor-inducing), вызывающие образование опухолей у растений, Col-плазмиды, кодирующие синтез бактериоцинов, и другие. Плазмиды биодеградации (D-плазмиды) бактерий содержат гены, контролирующие деградацию различных органических соединений (н-алканы, моно- и полициклические ароматические углеводороды, гетероциклические соединения). Метаболические пути деградации нафталина, салицилата, камфары, октана, ксилола или толуола часто кодируются плазмидными генами псевдомонад (Chakrabarty, 1976; Боронин, 1983). Плазмиды размером более 20 т.п.н., как правило, имеют генетические системы, ответственные за собственный перенос в другие клетки путем конъюгации (tra-системы). Частота конъюгационного переноса зависит от типа плазмиды и может составлять от 10^{-8} до 1 образовавшихся трансконъюгантов на клетку-донора. Неконъюгативные плазмиды, тем не менее, могут быть мобилизованы для конъюгационного переноса конъюгативными плазмидами (Боронин, 1983; Top et al., 2000; van Elsas et al., 2000).

2.1. Плазмиды биодеградации парафинов и циклопарафинов

С точки зрения генетической регуляции наиболее полно охарактеризован путь деградации н-алканов, кодируемый OCT плазмидой, бактерии *Pseudomonas putida* Gpo1 (Van Beilen et. al., 1994). Мембранолокализованная монооксигеназа, растворимый рубредоксин и рубредоксинредуктаза служат для переноса электронов через NADH к гидроксилазе, трансформируя алкан в спирт. Далее спирт окисляется с образованием альдегидов и кислот, которые участвуют в β-окислении и в цикле трикарбоновых кислот. Ван Бейлен (Van Beilen et al., 1994), Каноса (Canosa et al., 2000) и Панк (Panke et al., 1999) исследовали AlkS – регулятор октановой плазмиды; Юст (Yuste et al., 2001) занимался изучением системы катаболитной репрессии.

Было обнаружено, что оперон *alk*BFGHJKL кодирует ферменты, необходимые для превращения алканов в ацетил-винил CoA, а оперон *alk*ST кодирует рубредоксин редуктазу (AlkT) и позитивный регулятор для оперона *alk*BFGHJKL (AlkS) (Canosa et.al., 2000). Эти два оперона локализованы рядом и разделены участком ДНК размером 9,7 т.п.н. (*alk*N), гены которого кодируют белки, необходимые для преобразования метильной группы, а также участвуют в хемотаксисе к октану. Сравнительный анализ *IS*-элементов в штамме *P. putida* P1 показал, что содержание G+C-пар в *alk*-генах этого организма ниже, чем в OCT-плазмиде штамма *Pseudomonas putida* Gpo1, хотя возможно, что эти гены являются частью единого мобильного элемента (Canosa et.al., 2000).

Частично охарактеризованы две другие плазмидные системы: октановая плазмида в *Pseudomonas maltophilia* имеет ген *alk*A, отличающийся от гена, который присутствует в микроорганизме *P. putida* P1 (Lee et al., 1996), и от гена уникальной плазмиды pDEC в штамме *Pseudomonas* sp. C12B. Гейсдорфер с соавторами показал, что *Burkholderia cepacia* имеет гены *alk*B, негомологичные генам деградации алканов в микроорганизме *P. putida* P1 (Geissdorfer et al., 1999).

В штамме *Acinetobacter* sp. ADP1, *alk*M – терминальный ген алкангидроксилазы – регулируется геном *alk*R. Гены деградации алканов микроорганизма *Acinetobacter* sp. ADP1 имеют хромосомную локализацию (Geissdorfer et al., 1999). Гены *alk*M, *rub*A и *rub*B, кодирующие рубредоксин и рубредоксин редуктазу, в штамме *Acinetobacter* sp. M1 аналогичны соответствующим генам штамма *Acinetobacter* sp. ADP1. В клетках *Acinetobacter* sp. M1 два гена-регулятора отвечают за деградацию разных н-алканов: *alk*Ma индуцирует ферменты, участвующие в деградации твердых, длинноцепочечных алканов, с длиной цепи более C_{22}, а ген *alk*Mb ответственен за деструкцию жидких алканов (C_{16}–C_{22}).

Наличие различных алкановых гидроксилаз в одном штамме не является уникальным явлением. Две разные монооксигеназы, Cu-содержащая монооксигеназа и мембраносвязанная Fe-содержащая монооксигеназа, аналогичные монооксигеназам из *P. putida* были описаны для штамма *Nocardiodes* sp. GMo1 (Hamamura et al., 2001). Cu-содержащая монооксигеназа экспрессируется в ответ на широкий спектр алканов, а Fe-содержащая монооксигеназа экпрессируется при наличии алканов с более чем шестью атомами углерода. Следует отметить, что гены, кодирующие метаболизм алканов в штаммах *Acinetobacter* sp. M1 и *Nocardiodes* sp. CF8, не сгруппированы в кластер, как в OCT плазмиде (Ishige et al., 2000).

Гены, контролирующие деградацию алканов у родококков не гомологичны генам псевдомонад. Психротрофный штамм *Rhodococcus* sp. Q15, способен деградировать отдельные н-алканы и дизельное топливо при низкой температуре. Уайт показал, что этот штамм содержит две плазмиды размером 90 и 115 т.п.н., соответственно, участвующие в минерализации алканов и дизельного топлива. Генетическая характеристика штамма с помощью ПЦР и анализа нуклеотидных последовательностей показала, что штамм Q15 содержит ген, кодирующий алифатическую альдегид дегидрогеназу, и гомологичный гену A штамма *Rhodococcus erythropolis* (Whyte et.al. 1998).

Другой новый путь метаболизма был обнаружен в мутантном штамме *Rhodococcus* sp. В этом случае алифатические углеводороды преобразовывались в

метаболиты с двойными связями в *цис*-форме, в основном около 9-го углеродного атома от конечной метильной группы. Предполагается, что кофермент А-независимая *цис*-десатураза может участвовать в данном процессе (Roling, 2004).

Дутта и Хараяма показали, что деградация длинных боковых цепей *н*-алкилбензолов и *н*-алкилциклогексанов штаммом *Alcanivorax* sp. MBIC 4326 осуществляется в основном путём *β*-окисления (Dutta et al., 2001).

2.2. Плазмиды биодеградации ароматических углеводородов

Способность к деградации ароматических соединений у бактерий часто контролируется внехромосомными генетическими элементами – плазмидами (Табл. 1), получившими название «плазмиды биодеградации или D–плазмиды». Плазмиды биодеградации контролируют катаболизм бактериями таких соединений, как салицитат, нафталин, камфора, октан, толуол, ксилол, бифенил и т.д. К настоящему времени обнаружено достаточно много плазмид биодеградации, преимущественно у грамотрицательных бактерий рода *Pseudomonas*. Многие D–плазмиды контролирует полное разложение бактериями органических соединений.

Табл. 1. Примеры плазмид, содержащих гены деструкции МАУ и ПАУ.

Штаммы	Плазмиды	Субстраты	Размер плазмиды (т.п. н.)	Группа несовместимости
P. putida R1	SAL1	салицилат	85	IncP-9
P. putida PpG1	CAM	камфара	500	IncP-2
P. putida PaW1	pWWO	Ксилол, толуол	117	IncP-9
Acinetobacter calcoaceticus RJE74	pWW174	бензол	200	IncP-9
Pseudomonas sp. CIT1	pCIT1	анилин	100	-
P. putida ST	pEG	стирол	37	-
Pseudomonas sp. CF600	pRE4	изопропилбензол	105	-
P. putida CINNP	pVI150	фенол	-	IncP-2
P. putida PpG7	NAH7	Нафталин, фенантрен, антрацен	110	IncP-9
Pseudomonas sp. CB406	pWW100	бифенил	120	IncP-9

2.2.1 Плазмиды биодеградации моноциклических ароматических углеводородов

Питер Вильямс обнаружил в штамме *P. putida* mt-2 плазмиду pWWO, контролирующую способность данного штамма к росту на толуоле или ксилоле в качестве единственного источника углерода и энергии (Williams et.al., 1988).

Плазмида pWWO кодирует ферменты полного пути окисления толуола, при этом первичное окисление метильной группы толуола осуществляется толуол монооксигеназой, а разрыв ароматического кольца толуола катализируется катехол 2,3-диоксигеназой. Толуольные катаболические гены организованы в 2 оперона: верхний оперон, кодирующий ферменты расщепления толуола и ксилолов до бензоатов и толуатов, и нижний оперон, кодирующий ферменты деградации бензоатов и толуатов до интермедиатов цикла трикарбоновых кислот.

Работ, посвященных изучению катаболических плазмидных генов, отличных от генов плазмиды pWWO, известно немного. Верлен с соавт. исследовал эволюционно новый путь деградации хлорбензола штаммом *Pseudomonas* sp. P51 (Werlen et.al., 1996). При сравнении гомологии изучаемых ими генов и генных продуктов наиболее близкородственными генам плазмиды pWWO оказались толуольные гены, локализованные в хромосомном опероне F1 (todC1C2BAD), и бензольные гены деградации (*bed*C1C2BA и *bnz*ABCD), а наиболее отдаленными – гены деградации бифенила, нафталина и бензоата. Первые ферменты этого пути – хлорбензол диоксигеназа и цис-цисхлорбензол дигидродиол дегидрогеназа кодируются генами транспозона Tn5280, локализованного на плазмиде. Хлорбензол диоксигеназа состоит из комплекса 4-х белков, образованных продуктами генов *tcb*Aa большой субъединицы терминальной оксигеназы, *tcb*Ab малой субъединицы, *tcb*Ac ферредоксина и *tcb*Ad NADH- редуктазы. Подобно *tod*-кодирующим ферментам, хлорбензол диоксигеназа и цис-цисхлорбензол дигидродиол дегидрогеназа способны окислять 1,2-дихлорбензол, толуол, нафталин, и бифенил, но не бензоат, и соответственно дигидродиол- и дигидрокси- интермедиаты. Эти данные наводят на мысль, что новый путь деградации хлорбензола возник путем горизонтального переноса генов путей деградации толуола и бензола.

Хай-Мэнг Тан и Джереми Мейсон (Tan et. al., 1994) определили присутствие генов, кодирующих бензол диоксигеназу на катаболической плазмиде размером 112 т.п.н. из штамма *P. putida* ML2.

Установлено, что штамм *Pseudomonas* sp. P51 способен использовать 1,2-дихлорбензол, 1,4-дихлорбензол, и 1,2,4-трихлорбензол в качестве единственного источника углерода и энергии. Два генных кластера, участвующих в деградации этих соединений, были выявлены в катаболической плазмиде, pP51, с размером 110 т.п.н. с помощью гибридизации (Dabrock et. al., 1994).

Известно, что природный штамм *Rhodococcus* sp. DK17, способный расти на *o*-ксилоле, бензоле, толуоле, феноле, этилбензоле, изопропилбензоле и других

алкилбензольных изомерах, содержит две линейные плазмиды pDk1 (380 т.п.н.) и pDk2 (330 т.п.н.), причем плазмида pDk2 содержит гены деградации алкилбензолов (Kim et.al., 2002).

Хоменковым с коллегами проведено ПЦР-клонирование генов катехол-1,2- (C1,2O) и катехол-2,3- диоксигеназы (C2,3O)- ключевых ферментов орто-и мета-путей утилизации ароматических углеводородов из микробных консорциумов, утилизирующих в условиях лабораторных мини-реакторов такие соединения как толуол, стирол, этилбензол, *о*-ксилол, *м*-ксилол и нафталин (Хоменков с соавт., 2005). Показано наличие генов обоих путей в консорциуме, утилизирующем *м*-ксилол; только генов *орто*-пути в консорциумах, утилизирующих *о*-ксилол, стирол и этилбензол, и только генов *мета*-пути в консорциумах, утилизирующих нафталин и толуол. Клонированные гены *орто*-пути (C1,2O) из консорциумов, утилизирующих стирол и этилбензол, были сходны с аналогичными генами, локализованными на плазмиде pND6 из *Pseudomonas putida*, гены *орто*-пути из консорциумов, утилизирующих *о*-ксилол и *м*-ксилол, сходны с генами хромосомной локализации *P. putida*. Гены *мета*-пути (C2,3O) из консорциумов, утилизирующих толуол и нафталин, были близки к аналогичным генам, ранее описанным для плазмид pWWO и pTOL.

Хальер-Сулье выделил штамм MX из загрязненного бензином грунта. Штамм был идентифицирован как *Pseudomonas putida*, несущий плазмиду (pMX), содержащую *xyl*-гены, кодирующие бензол монооксигеназу и катехол-2,3-диоксигеназу, участвующие в путях деградации толуола или м-ксилола. Этот новая TOL-подобная плазмида была стабильна на протяжении двух сотен генераций. После конъюгационного переноса плазмиды в штамм *P. putida* F1, который обладает *tod*-хромосомным путем биодеградации толуола, трансконъюгант *P. putida* F1(pMX) был способен расти на бензоле, толуоле, м-ксилоле, п - ксилоле и этилбензола в качестве единственных источников углерода, что подтверждает плазмидную локализацию соответствующих генов. Интересно отметить, что катехол-2,3-диоксигеназа в трансконъюгантом штамме обладала более широкой субстратной специфичностью, по сравнению с донорной и реципиентной клетками (Hallier-Soulier et.al., 1999).

Объединение разных метаболических путей в одном микроорганизме с помощью конъюгации – это лишь один из способов создания бактерий с новыми свойствами. Расширить их катаболические возможности можно и другим путем, модифицируя гены, кодирующие ферменты того или иного метаболического пути.

Длительные исследования путей деградации галогенсодержащих ксенобиотиков показали, что для получения «суперштамма», эффективно

разлагающего такие ксенобиотики, нужно модифицировать катаболический механизм деградации этих ароматических соединений. Идея конструирования катаболических путей принадлежит Рейнеке и Кнакмуссу (Reineke and Knackmuss, 1980), создавшим штамм *Pseudomonas*, способный деградировать 4-хлорбензоат. В эксперименте по скрещиванию штамма *Pseudomonas putida* PaW1, обладающего плазмидой pWWO с *Pseudomonas* sp. B13 (pWR1), утилизирующим 3-хлорбензоат, они получили трансконьюгант, способный использовать 4-хлорбензоат в результате переноса гена толуол-1,2-диоксигеназы (локализованного на плазмиде pWWO), в штамм *Pseudomonas* sp. B13 (Frantz et al., 1987).

2.2.2 Плазмиды биодеградации полициклических ароматических углеводородов

К настоящему времени детально изучен генетический контроль биодеградации нафталина. В большинстве штаммов псевдомонад окисление нафталина и салициловой кислоты полностью или частично детерминируется плазмидными генами (Yen, Serdar, 1988; Кулакова, 1988), однако был выделен штамм *Pseudomonas stutzeri*, в котором эти гены полностью локализованы на хромосоме (Rossello-Mora et. al., 1994).

Первые плазмиды биодеградации нафталина и салициловой кислоты были открыты в начале 70-х годов XX века (Dunn, Gunsalus, 1973). Данн в штамме *P. putida* G7 обнаружил плазмиду, обозначенную как NAH, детерминирующую способность данного штамма к росту на нафталине и салицилате в качестве единственного источника углерода и энергии и кодирующую мета-путь расщепления катехола. Плазмида NAH кодирует ферменты полного пути окисления нафталина, в частности, ключевые ферменты: нафталин диоксигеназу, салицилат гидроксилазу и катехол 2,3-оксигеназу. Было показано, что нафталиноксигеназа и ряд других ферментов метаболизма нафталина индуцируется в клетках псевдомонад салицилатом, а также его структурными аналогами: 2-аминобензоатом и 2-оксибензиловым спиртом. Известно, что нафталин диокигеназа является катализатором 76 реакций, что обуславливает широкую субстратную специфичность штаммов, имеющих гены, кодирующие данный фермент.

Позднее Данном были изолированы еще две плазмиды биодеградации нафталина – pND140 и pND160 (Dunn et. al., 1980). Обе плазмиды конъюгативны, контролируют расщепление нафталина через салицилат, катехол и далее по *мета*-пути. Плазмиды pND140 и pND160 отличаются от плазмиды NAH оптимальным

значением pH для катехол-2,3-оксигеназы (pH 7.2 для pND140 и pND160 и pH 8.3 для NAH).

Коннорс и Барнсли описали плазмиды биодеградации нафталина NAH2 и NAH3, выделенные из штаммов псевдомонад NCIB9816 и PG, соответственно (Connors and Barnsley, 1982). Причем в обоих штаммах ферменты "верхнего" пути индуцировались салицилатом и аминобензоатом, тогда как ферменты мета-пути в штамме PG (NAH3) синтезировались конститутивно на высоком уровне, а в штамме NCIB9816 (NAH2) обнаруживалась низкая конститутивная активность этих ферментов. Эти плазмиды оказались близкородственными плазмиде NAH.

Позднее, из морских осадков при селекции на нафталине были выделены штаммы *Moraxella* sp., синтезирующие нафталин оксигеназу, салицилат гидроксилазу и катехол-2,3-оксигеназу (Tagger et al., 1984). Авторы связывают способность к окислению нафталина с наличием в штаммах плазмид.

Большая работа по изучению плазмид биодеградации нафталина проведена в ИБФМ РАН, г. Пущино (Боронин с соавт., 1980; Борисоглебская, Боронин, 1983; Скрябин, Головлева, 1986; Кошелева с соавт., 1986; Суржко с соавт., 1995; Filonov et al., 2006; Ахметов с соавт., 2006; Кошелева с соавт., 2006; Филонов с соавт., 2005). С целью изучения вопроса о распространении и разнообразии плазмид, контролирующих деградацию нафталина, использовали штаммы псевдомонад из коллекции лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН, а также выделяли бактерии из образцов почв, загрязненных различными углеводородами. Подробное изучение штаммов, в которых были обнаружены плазмиды биодеградации нафталина, показало, что большинство штаммов относится к видам *P. putida* или *P. fluorescens* (Кочетков с соавт., 1997). Показано, что плазмиды биодеградации нафталина контролируют, как правило, полный путь катаболизма этого соединения с использованием мета-пути расщепления катехола, например, NAH7, pBS101, pSN11 (Ferrero et al., 2002). В случае, когда плазмида не имеет генов, кодирующих ферменты мета-пути расщепления катехола, или эти гены по какой-либо причине не функционируют, необходим хромосомный орто-путь.

В. В. Кочетковым (Кочетков с соавт., 1985) было охарактеризовано 13 плазмид биодеградации нафталина, обнаруженных в псевдомонадах, выделенных из образцов почвы, загрязненных продуктами коксохимических производств. Сравнительное изучение свойств плазмид биодеградации нафталина показало, что они отличаются между собой как по размерам, так и по способности к конъюгационному переносу и признаку несовместимости (Inc P-2, P-7 и P-9). Кроме того, было показано, что

плазмиды детерминируют различные пути катаболизма нафталина. Плазмиды pBS3, pBS211, pBS213, pBS215, pBS218, pBS219, pBS242 и pBS243 контролируют полное окисление нафталина через салициловую кислоту с использованием мета - пути окисления катехола.

В 70-е годы XX века Чакрабарти и его коллеги создали первый мультиплазмидный бактериальный штамм, обладающий расширенными катаболическими возможностями (Chakrabarty, 1976). Он расщеплял углеводороды нефти и был назван «супербацилла». Для его получения использовали плазмиды, каждая из которых кодировала фермент, расщепляющий определенный класс углеводородов: плазмида CAM детерминировала деградацию камфары, OCT – октана, NAH - нафталина и XYLl – ксилола. Сначала путем конъюгации перенесли плазмиду CAM в штамм, несущий плазмиду OCT. Эти две плазмиды несовместимы, но в результате произошедшей между ними рекомбинации образовалась одна плазмида, объединяющая их функции. Затем аналогичным путем плазмиду NAH перенесли в штамм, несущий плазмиду XYL. Эти плазмиды совместимы и могут сосуществовать в одной клетке–хозяине. И, наконец, гибридную плазмиду перенесли в штамм, несущий плазмиду NAH и XYL. В результате всех этих манипуляций получили штамм, который рос на неочищенной нефти лучше исходных штаммов, взятых по отдельности или вместе.

Пориц А.Л. с соавт. сконструировали гибридную плазмиду pBS251, содержащую гены деградации *н*-алканов ряда C_6-C_{12} (Porits et al., 1983). Эти же авторы получили штамм *Pseudomonas aeruginosa* BS315, способный к деградации алифатических, ароматических и циклических углеводородов нефти. У штамма *P. aeruginosa* BS313 Пориц выделила мутанты, обладающие способностью использовать октан в качестве единственного источника углерода и энергии. В один из таких мутантных штаммов *P. aeruginosa* BS316 с помощью конъюгации перенесены плазмиды биодеградации камфары и нафталина. Полученный мультиплазмидный штамм, способный эффективно разлагать углеводороды нефти, был запатентован.

2.3. Мобильные генетические элементы в составе плазмид

Обширную группу мобильных генетических элементов (МГЭ) образуют транспозоны, сегменты ДНК, способные к внутри- или межхромосомным перемещениям. Катаболические транспозоны часто расположены на плазмидах (Tsuda et al., 1999). Хорошо известны транспозоны II класса в составе плазмид pWW0 и

NAH7, а также описано несколько транспозонов I класса, расположенных в составе IncP-1 плазмид, например, pBRC60 (табл. 2).

Транспозоны I класса являются структурами, в которых катаболические гены фланкированы двумя копиями очень похожих, но неидентичных IS-элементов (insertion sequences), транспозиционные модули с одной-двумя открытыми рамками считывания в центре, кодирующими транспозазу, и левым и правым инвертированными повторами) в прямой или обратной последовательности (Top et al., 2002). Транспозоны II класса несут короткие концевые инвертированные повторы и переносятся в репликативном режиме при участии транспозаз и резолваз.

В последнее время в состав МГЭ, которые несут детерминанты деградации, кроме транспозонов I и II классов стали включать мозаичные МГЭ, такие как геномные острова (Van der Meer et al., 2001; Springael et al., 2001; Van der Meer and Sentchilo, 2003), конъюгативные транспозоны (в основе имеют ген фагоподобной интегразы с регуляторными генами и гены tra-системы плазмид) и интегративные плазмиды (Toussaint and Merlin, 2002), способные встраиваться в хромосому бактерии (Osborn and Böltner, 2002; Top and Springael, 2003). Следует отметить, что на МГЭ и в хромосоме катаболические гены часто фланкированы IS-элементами. IS-элементы могут играть роль при «захвате» репликоном (плазмидой или хромосомой) данных генов, а также увеличивают потенциал обмена этими генами между различными бактериальными хозяевами и репликонами (Springael et al., 1996; Di Gioia et al., 1998; Schmid-Appert et al., 1997). Обнаружено, что IS1071-подобные последовательности фланкируют многие гены плазмидного происхождения в грамотрицательных (гены деструкции хлорбензоатов c*baABC* штамма Alcaligenes sp. BR60, хлорацетата *dehH2* штамма Moraxella sp. B и др.) и грамположительных (гены деструкции атразина atzBC штаммов Arthrobacter crystallopoietes) микроорганизмах (DiGioia et al., 1998; Rousseaux et al., 2002). Результаты работы Пеларендса с соавт. (Poelarends et al., 2000) свидетельствуют об участии интегразы (фермента, обеспечивающего выщепление-встраивание гена в ДНК) в распространении катаболических генов.

Геномные острова – это большие мобильные (или потенциально мобильные) последовательности ДНК размером от 10 до 500 т.п.н., которые встроены в хромосомную или плазмидную ДНК (Top and Springael, 2003) и обычно несут гены интеграз и генные модули, сходные с генами tra-системы плазмид. Показано, что некоторые из этих элементов конъюгативны. В других их способность к переносу предполагается исходя из наличия генов интеграз в последовательности ДНК (Osborn and Böltner, 2002). Описаны встроенные в геномные острова мобильные гены,

кодирующие деградацию органических ксенобиотиков, к которым относятся clc-элемент (Van der Meer and Sentchilo, 2003) и транспозон Tn4371 (Toussaint et al, 2003). По-видимому, Tn4371 и clc-элемент являются членами двух различных семейств геномных островов с широким кругом хозяев, которые широко распространены среди бактерий географически различных мест обитания и принимают участие в распространении различных генов вследствие способности к геномным перестройкам (табл. 2).

Табл. 2. Примеры различных катаболических плазмид P-1 группы несовместимости и содержащихся в них мобильных генетических элементов (по: Top and Springael, 2003).

Плазмида или МГЭ	Штамм	Суб-страт(ы)	Размер (т.п.н.)	Описание катаболического мобильного элемента
1	2	3	4	5
Плазмиды				
pSS60	*Achromobacter* sp. LBS1C1	4-хлор-бензоат	53	Обнаружена встройка генного кластера биодеградации 4-хлорбифенила, представленного на хромосомном мобильном элементе (Springael et al., 2001)
pBRC60	*Alcaligenes* sp. BR60	3-хлор-бензоат	75	Содержит Tn5721 с генами деградации (DiGioia, 1998)
pENH91	*Ralstonia eutropha* NH9	3-хлор-бензоат	78	Содержит сложный транспозон Tn5707 с генным модулем, эволюционно сходным с генными модулями деградации хлоркатехола, представленными на плазмидах pP51 и p PS12-1, на clc-элементе, на плазмиде pJP4 (Ogawa and Miyashita, 1999)
pJP4	*Ralstonia eutropha* JMP134	2,4-ди-хлорфен-оксиацетат	75	Несет различные генные модули деградации. Содержит повторы генов деградации катехола и подвержена перестройкам. Плазмида содержит IS-элементы, фланкирующие гены хлоркатехола, и IS1071-подобные элементы (Don and Pemberton, 1981)
pTSA	*Comamo*nas *testosteroni* T-2	пара-толуол-сульфоно-вая кислота	85	Несет две копии генного кластера tsa, кодирующего деградацию субстрата. Копии фланкированы двумя IS1071-элементами, образующими предположительно сложный транспозон (Tralau et al., 2001)

1	*2*	3	4	5
pP51	*Pseudomonas* sp. P51	хлорбензол		Несет генный модуль деградации хлоркатехола. Кроме того, несет сложный катаболический транспозон Tn5280. Представляет собой явный пример сложносоставного природного пути (Werlen et al., 1996)
pPS12-1	*Burkholderia* sp. PS12	1,2,4,5-тетрахлор-бензол	85	Несет генный модуль деградации хлоркатехола (см. выше pENH91). Также кодирует сложный транспозон, несущий tecAB-гены деградации хлорбензоата в хлоркатехол. Данные tecAB-гены сходны с tcbAB-генами штамма P51, но фланкированы остатками толуольного пути различного размера (Beil et al., 1999).
Транспозоны I класса				
Tn5280	*Pseudomonas* sp. P51	хлорбензол	8,5	Находится на плазмиде pP51, несет tcbAB-гены, ответственные за трансформацию хлорбензоата в хлоркатехол. Гены tcbAB возникли из одного из путей деградации толуола, о чем свидетельствует наличие остатков толуольных генов, фланкирующих гены tcbAB (Werlen et al., 1996).
Tn5271	*Alcaligenes* sp. BR60 (pBRC60)	хлорбен-зоат	17	Находится на плазмиде pBRC60. Несет гены катаболизма хлорбензоата cba. Гомологичные транспозоны найдены у других штаммов-деструкторов хлорбензоата из разных географических районов. Иногда несут остатки генов других катаболических путей (DiGioia, 1998).
Tn5707	*Ralstonia eutropha* NH9 (pENH91)	3-хлор-бензоат	15	Находится на плазмиде pENH91. Несет гены, эволюционно сходные с генами деградации хлоркатехола плазмид pP51 и pPS12-1, clc-элемента и pJP4 (Ogawa and Miyashita, 1999).
DEH	*Pseudomonas putida* PP3	галогени-рованные жирные кислоты	9,74	Транспозон содержит ген дегалогеназы и ограничен двумя копиями IS-элемента ISPpu12, который фланкирует и другие катаболические гены (Weightman et al., 2001).

1	2	3	4	5
Транспозоны II класса				
Tn4651	*Pseudomonas putida* mt-2 (pWW0)	толуол, ксилол	56	Несет генные модули деградации толуола/ксилола через катехол, находится между двумя IS-элементами. Расположен внутри другого транспозона Tn4663. Эти гены сходным образом организованы во многих других TOL-плазмидах (Sentchilo et al., 2000; Tan, 1999).
Tn4653	*Pseudomonas putida* mt-2 (pWW0)	толуол, ксилол	70	Несет транспозон Tn4651 (Tan, 1999).
Tn4655	*Pseudomonas putida* G7(NAH7)	нафталин	38	Несет три генных модуля, кодирующих деградацию нафталина через катехол. Организация модуля, кодирующего деградацию катехола, подобна организации модуля pWW0 (Tan, 1999).
Геномные острова				
Tn4371	*Ralstonia oxalatica* A5	бифенил/4-хлор-бифенил	55	Является необычной комбинацией фагоподобных генов (включая интегразу), катаболических генов и генов плазмидного переноса. Подобные элементы найдены в других деструкторах полихлорированных бифенилов (Springael et al, 2001).
clc-элемент	*Pseudomonas* sp. B13	хлор-катехол	105	Несет генный модуль деградации хлоркатехола, подобный генному модулю плазмид pP51, pPS12-1 и pENH91 (Van der Meer et al., 2001).

2.4 Роль катаболических плазмид в деградации углеводородов нефти

Взаимодействие природных микробных популяций с нефтью и другими углеводородами приводит к избирательному преимуществу штаммов, обладающих плазмидами, кодирующими ферменты для деградации углеводородов, в результате чего увеличивается частота присутствия плазмид в популяции. Косвенные доказательства роли плазмид в адаптации микроорганизмов к присутствию углеводородов были приведены в ряде исследований, в которых увеличение частоты встречаемости и/или многообразия плазмид были отмечены среди бактерий, выделенных из мест углеводородных загрязнений окружающей среды. Описано много примеров участия плазмид в деградации короткоцепочечных алканов, замещенных и незамещенных ароматических углеводородов и других ксенобиотиков (Sayler, 1990; Wallace et al., 1992; Harayma et al., 1990; Top et al., 2002).

Хада и Сайзмор (Hada and Sizemore, 1981) сравнили количество плазмидосодержащих и мультиплазмидных штаммов, выделенных из территории нефтяных месторождений и контрольного сайта Северо-Западного Мексиканского залива. В результате эксперимента они обнаружили, что микроорганизмы, выделенные из загрязненных сайтов, содержали на 12% больше плазмидосодержащих и на 29% больше мультиплазмидных штаммов по сравнению с бактериями, выделенными из незагрязненного нефтью участка. Бёртон и др. (Burton et al., 1982) сообщили, что 15% из аэробных гетеротрофных бактерий, выделенных из загрязненных бытовыми и промышленными стоками рек, содержали плазмиды, по сравнению с 10% бактерий из незагрязненных территорий, расположенных выше по течению. Фредриксон и др. (Fredrickson et al., 1988) обнаружили, что у бактерий, выделенных из более глубоких слоев (29 и 260 м) земных участков, чаще наблюдается присутствие плазмиды (31-39%) по сравнению с микроорганизмами поверхности почвы (14%) или неглубокими водоносный горизонтами (16%). Они выдвинули гипотезу, что крупные плазмиды, ассоциированные с бактериями из более глубоких слоев, некоторые из которых гибридизуются в TOL-плазмидном образце, содержат гены деградации ароматических соединений.

У штаммов *Pseudomonas fluoresceins*, обладающих способностью к деградации нафталина, обнаружены плазмиды размером от 20 до 120 т.п.н. (pMC33, pNK43, pOS18, pOS19, pA24, pA88, pA96 и pi-1), которые содержат катаболические гены, ответственные за полную утилизацию нафталина и салицилата (Кочетков и др., 1997; Измалкова, 2004; Волкова и др., 2005). Показано, что деструкция фенантрена также осуществляется благодаря плазмидам, содержащимся в клетках микроорганизмов *P. fluorescens* и *P. aureofaciens* (Балашова и др., 1997; Анохина и др., 2004). В процессе биодеградации минерального масла и гексадекана также была выявлена роль плазмид, показана передача плазмид биодеградации в бесплазмидные дериваты исходного штамма и в штаммы псевдомонад путем трансформации и путем мобилизационного конъюгационного переноса (Плешакова и др., 2005).

Благодаря рекомбинационным событиям под селективным давлением окружающей среды возникают новые комбинации катаболических генов и оперонов, которые приводят к появлению штаммов-деструкторов, наиболее приспособленных к существованию в условиях данной экологической ниши (Измалкова, 2004).

Глава 3. Распространение катаболических плазмид в природе

3.1.Конъюгационный перенос катаболических плазмид и трансформация

Плазмидная ДНК играет важную роль в генетической адаптации микроорганизмов, так как присутствие мобильных форм ДНК, которые могут передаваться путем конъюгации или трансформацией, способствует появлению новых фенотипов, включая углеводородокисляющую способность (Рис. 3). Использование микроорганизмов, содержащих мобильные катаболические гены, является перспективным подходом в биоремедиации, поскольку даже в том случае, если интродуценты неконкурентоспособны и постепенно элиминируются, тем не менее, они могут быть донорами генов биодеградации вследствие конъюгационного переноса плазмид (Ахметов, 2006). Возможен другой путь распространения генов биодеградации: клетка-хозяин погибает и лизируется, после чего катаболические плазмиды и мобильные генетические элементы попадают в окружающую среду и при контакте с подходящим новым хозяином путем трансформации могут встраиваться в геном микробной клетки. Этот процесс происходит как в водной среде, так и в почве, о чем свидетельствуют публикации, обобщенные в обзорах Прозорова (Прозоров, 1999), Томаса и Ниелсена (Thomas and Nielsen, 2005). Существует и третий механизм генетической рекомбинации – трансдукция, перенос генов бактериофагами. Различные фаги могут переносить 20–40 т.п.н. ДНК, а частота возникновения трансдуктантов на клетку обычно низка: 5–10 и менее (Прозоров, 1999). Поэтому следует полагать, что роль трансдукции в переносе катаболических генов невелика.

Интродуцированные микроорганизмы, содержащие конъюгативные плазмиды биодеградации в местах загрязнения могут также пополнять плазмидный пул. Например, плазмида может реплицироваться и в клетках микроорганизмов, в которых не наблюдается функциональной экспрессии генов биодеградации, т.е. происходит своеобразное депонирование генов. Такие микроорганизмы могут быть донорами катаболических плазмид, что обеспечит дальнейшее распространение генов биодеградации в смешанных микробных популяциях. Рядом авторов (Hogan et al., 1997; Saboo and Gealt, 1998; Jesenska et al., 2002) было показано наличие неэкспрессирующихся генов биодеградации в грамположительных бактериях. Известны плазмиды-космополиты с широким кругом хозяев, относящиеся к IncP-1 и IncP-4 группам, причем в первую группу входят и катаболические плазмиды, например, широко известные плазмиды биодеградации 2,4-дихлорфеноксиацетата pJP4 (Don and Pemberton, 1981), pBRC60 (Di Gioia et al., 1998) и др.

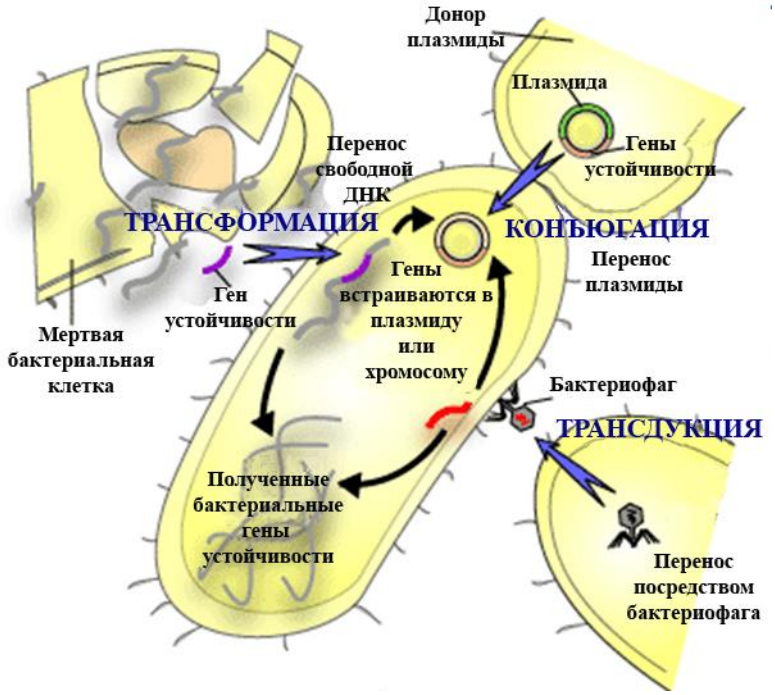


Рис. 3. Основные пути переноса генов и плазмид в природе.

В загрязненных почвах сильное селективное давление благоприятствует конъюгационному переносу соответствующих плазмид (Dejonghe et al., 2000; De Lipthay et al., 2001). Горизонтальный перенос плазмид может ускорить появление новых катаболических путей, необходимых для разрушения углеводородов нефти.

Работы по исследованию переноса катаболических плазмид достаточно многочисленны и интересны, они описывают перенос в разнообразных средах, таких как почва, морская и пресная вода, а также растения.

Одна из самых ранних работ (Brokamp and Schmidt, 1991) посвящена деградации 2,2-дихлорпропионата в почве и связанному с ней процессу переноса плазмиды pFL140, содержащей гены галидогидролазы галоалкановой кислоты, из донорного штамма *Alcaligenes xylosoxidans* ABIV в аборигенные бактерии в нестерильной почве и дополнительно внесенный в стерильную почву реципиентный штамм *Pseudomonas fluorescens* R2f (табл. 3).

Изучен перенос плазмиды pPB111 и биодеградацию 2,5-дихлорбензоата в почве без и с ризосферой фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*). Штамм *Pseudomonas fluorescens* 2-79 RLD с плазмидой pPB111, содержащей гены, кодирующие хлорбензоат-1,2-диоксигеназу, которая трансформирует *орто*-хлорбензоаты в их соответствующие катехолы, был использован в качестве донора (Crowley et al., 1996). Реципиентами оказались почвенные аборигенные микроорганизмы, которые были определены как представители родов *Acinetobacter, Klebsiella, Pseudomonas*.

Большое количество работ посвящено переносу плазмид, кодирующих ферменты деградации 2,4-дихлорфеноксиацетата (2,4-Д), главным образом, плазмиды pJP4. Нейлсон с соавт. (Neilson et al., 1994) продемонстрировали перенос плазмиды pJP4 в супесчаной стерильной почве без 2,4-Д и нестерильной почве, содержащей 2,4-дихлорфеноксиацетат в концентрации 0,1 г/кг почвы. Роль донора играл штамм *Alcaligenes eutrophus* JMP134, реципиентом был штамм *Variovorax paradoxus*.

В следующей работе те же авторы (DiGiovanni et al., 1996) инокулировали *A. eutrophus* JMP134 в нестерильную почвенную модельную систему и наблюдали перенос плазмиды pJP4 в почвенные аборигенные бактерии, идентифицированные как *Pseudomonas glathei, Burkholderia caryophylii, Burkholderia cepacia*.

В дальнейшем Ньюби с соавт. (Newby et al., 2000a) продолжили изучение переноса плазмиды pJP4 в супесчаной нестерильной почве без и с добавлением 2,4-Д в различных концентрациях, используя штамм *Escherichia coli* ATCC 15224, у которого на хромосоме отсутствовали гены для полной деградации 2,4-Д, в качестве донора плазмиды. Реципиентами были аборигенные микроорганизмы родов *Burkholderia* и *Pseudomonas*.

Для оценки влияния биоаугментации (интродукции штаммов-деструкторов) на перенос плазмид в открытой почве было проведено пилотное полевое исследование с двумя pJP4-несущими микроорганизмами: вышеупомянутым штаммом *Ralstonia eutropha* JMP134 и *E. coli* D11 (Newby et al., 2000b). Штамм *R. eutropha* JMP134 содержал хромосомные гены, необходимые для утилизации 2,4-Д, в хромосоме E. coli D11 они отсутствовали. В почву добавляли 2,4-Д в одном случае и 2,4-Д вместе с кадмием во втором случае. Для оценки повторного загрязнения в одном из вариантов опыта была проведена реинокуляция 2,4-Д. Трансконъюгантами оказались микроорганизмы родов *Burkholderia* и *Ralstonia*.

Завершающим цикл работ этих авторов было исследование (Newby and Pepper, 2002), посвященное переносу и распространению плазмиды pJP4 (распространение плазмиды включает транспорт донора, перенос в аборигенные микробы и/или транспорт или рост полученных трансконъюгантов) в супесчаной нестерильной почве с протоком раствора CaCl2 (0,01 M) и добавлением 2,4-Д в концентрации 1,5 г/кг почвы. Слой почвы глубиной 2,5 см инокулировали ранее использовавшимся донорным штаммом *E. coli* D11.

Ка с соавт. (Ka and Tiedje, 1994) показали возможность межродового переноса плазмиды биодеградации 2,4-дихлорфеноксиацетата pKA2.

Другая группа исследователей также опубликовала несколько работ, посвященных биодеградации 2,4-Д и переносу катаболических плазмид (Top et al., 1998, 1999, 2000; Dejonghe et al., 2000).

Де Липтхе с соавт. (De Lipthay et al., 2001) показали, что горизонтальный перенос tfdA гена, находящегося в плазмиде pRO103, в реципиентный штамм, утилизирующий фенол, существенно увеличивает скорость деградации феноксиацетата в стерильных и нестерильных почвенных микрокосмах. Ген tfdA кодирует 2,4-дихлорфеноксиацетат/2-оксоглутарат диоксигеназу, причем в сочетании с реципиентными хромосомными генами пути деградации фенола микроорганизм становится способным утилизировать расширенный катаболический ряд субстратов, включая феноксиацетат. Донором был штамм E. coli (pRO103), реципиентом – деструктор фенола *R. eutropha* AEO106.

Табл. 3. Основные работы, посвященные переносу катаболических плазмид между микроорганизмами.

Донор	Реципиент	Плазмида, (группа несовмес-тимости)	Катабо-лизируемый субстрат	Среда	Ссылка
1	2	3	4	5	6
Alcaligenes xylosoxidans ABIV	аборигенные бактерии и *Pseudomonas fluorescens* R2f	pFL140	2,2-дихлор–пропионат	почва	Brokamp and Schmidt, 1991
Pseudomonas fluorescens 2-79 RLD	аборигенные микроорганизмы *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*	pPB111	2,5-дихлор-бензоат	почва	Crowley et al., 1996
Alcaligenes eutrophus JMP134	*Variovorax paradoxus*	pJP4 (IncP-1)	2,4-дихлор-феноксиацетат	почва	Neilson et al., 1994
Alcaligenes eutrophus JMP134	аборигенные бактерии *Pseudomonas glathei*, *Burkholderia caryophylii*, *Burkholderia cepacia*	pJP4 (IncP-1)	2,4-дихлор-феноксиацетат	почва	DiGiovanni et al., 1996)
Escherichia coli ATCC 15224	аборигенные микроорганизмы родов *Burkholderia* и *Pseudomonas*	pJP4 (IncP-1)	2,4-дихлор-феноксиацетат	почва	Newby et al., 2000b

1	2	3	4	5	6
Ralstonia eutropha JMP134 и *E. coli* D11	аборигенные микроорганизмы родов *Burkholderia* и *Ralstonia*	pJP4 (IncP-1)	2,4-дихлор-феноксиацетат	откры-тая почва	Newby et al., 2000a
Escherichia coli D11	аборигенные микроорганизмы	pJP4 (IncP-1)	2,4-дихлорфеноксиацетат	почва	Newby and Pepper, 2002
Escherichia coli X11-Blue	*Ralstonia eutropha* JMP134	pEMT1k и pEMT3k	2,4-дихлорфеноксиацетат	почва	Top et al., 1998
Pseudomonas putida UWC3	Аборигенные микроорганизмы *Ralstonia eutropha*	pEMT1k	2,4-дихло-рфеноксиацетат	почва	Top et al., 1999
Pseudomonas putida UWC3	Аборигенные микробы	pEMT1k и pJP4 (IncP-1)	2,4-дихлор-феноксиацетат	почва	Dejonghe et al., 2000
Pseudomonas fluorescens C5t	Аборигенные микроорганизмы	pJP4 (IncP-1)	2,4-дихлор-феноксиацетат	почва	Daane et al., 1996
Alcaligenes eutrophus	*Pseudomonas fluorescens*	pJP4 (IncP-1)	2,4-дихлор-феноксиацетат	почва	Daane et al., 1997
Pseudomonas putida EEZ15	*Pseudomonas putida* EEZ3	pWW0-EB62 (IncP-9) и pWW0-EB62K (IncP-9)	толуол	почва	Ramos-Gonzalez et al., 1991
Pseudomonas fluorescens OS81	аборигенные почвенные микроорганизмы родов *Pseudomonas* и *Burkholderia*	pWW0::Km (IncP-9)	толуол	почва	Sarand et al., 2000
Enterobacter agglomerans DMK3	аборигенные почвенные микроорганизмы *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas corrugata* и *Comamonas* sp.	RP4::Tn4371	бифенил и 4-хлорбифенил	почва	De Rore et al., 1994

1	2	3	4	5	6
Аборигенные микроорганизмы	Cg21.CR	pCg21	нафталин	почва	Hohnstock et al., 2000
Pseudomonas putida FR120 и *Pseudomonas putida* KT2440	*Pseudomonas putida* UWC1	pFRC20P pWW0-EB62 (IncP-9)	3-хлор-бензоат и 4-метил-бензоат 4-этилбензоат	активный ил	Nüßlein et al., 1992
Alcaligenes sp. BR611 *Alcaligenes* sp. BR60	аборигенные микроорганизмы	pBRC60 (IncP-1)	3-хлор-бензоат, 4-хлоранилин, 3-хлор-бифенил, 2,4-дихлор-фенок-сиацетат	проточ-ные микро-космы	Fulthorpe and Wyndham, 1992
Pseudomonas putida RI Rifr и *Pseudomonas putida* KT2442	*Pseudomonas putida* RI	pWW0 (IncP-9)	бензиловый спирт	био-пленка проточ-ной камеры	Christensen et al., 1998
Pseudomonas putida KT2440	*Pseudomonas putida* UWC6, аборигенные микроорганизмы	pD10 pQKH6	3-хлорбензоат	эпи-литон	Hill et al., 1994
Pseudomonas putida HC1	аборигенные морские бактерии *Micrococcus* sp., *Micrococcus luteus* и *Micrococcus varians*	pHCL	некоторые парафины и аромати-ческие соединения сырой нефти	морская вода	Latha and Lalithakumari, 2001
Pseudomonas putida KT2442::lacIq	*Pseudomonas putida* KT2440	pWW0 (IncP-9)	толуол	филло-сфера фасоли	Normander et al., 1998

Отдельно стоит выделить работы Даане с соавт. (Daane et al., 1996; 1997) по изучению влияния почвенной биоты (дождевых червей) на перенос плазмиды pJP4. В первой работе (Daane et al., 1996) была проведена оценка влияния деятельности дождевых червей *Lumbricus terrestris, L. rubellus, Aporrectodea* trapezoides на перенос плазмиды pJP4 из донора *Pseudomonas fluorescens* C5t(pJP4) в аборигенные почвенные микроорганизмы. Факт переноса плазмид подтверждали гибридизацией колоний трансконъюгантов с mer-зондами (ген mer кодирует 4-метил-2-энелактон изомеразу). Трансконъюганты относились к родам *Acidovorax, Acinetobacter, Agrobacterium,*

Pasteurella, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*. Во второй работе (Daane et al., 1997) изучили эффект активности дождевых червей вышеупомянутых видов на перенос этой же плазмиды между пространственно разделенными донором *Alcaligenes eutrophus* и реципиентом *Pseudomonas fluorescens* в нестерильных почвенных колонках.

Известно несколько работ, посвященных исследованию переноса производных плазмиды биодеградации толуола pWW0 в почве. Рамос-Гонзалес с соавт. (Ramos-Gonzalez et al., 1991) изучали межвидовой и межродовой перенос плазмид биодеградации толуола pWW0-EB62 и pWW0-EB62K в стерильной почве из *P. putida* EEZ15 в *P. putida* EEZ3 и *Escherichia coli* EEZ8000. Авторами не было зафиксировано межродового переноса. В работе Саранд с соавт. (Sarand et al., 2000) оценивали перенос плазмиды pWW0::Km в микоризе гриба *Suillus bovinus* и свободной почве из интродуцированного донорного штамма *Pseudomonas fluorescens* OS81 в аборигенные почвенные микроорганизмы. Трансконъюганты были представлены бактериями родов *Pseudomonas* и *Burkholderia*.

Группой финских исследователей (Tiirola et al., 2002) был проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и pcpB - гена, кодирующего пентахлорфенол-4-монооксигеназу, у различных сфингомонад, выделенных из подземного источника Kärköla. Полученные ими филогенетические деревья на основе сходства 16S рДНК и pcpB-гена оказались различными, что, по-видимому, говорит в пользу горизонтального переноса генов катаболизма хлорфенола между различными штаммами сфингомонад.

Также ван дер Меером с соавт. (Van der Meer et al., 1998) было показано, что в одном штамме-деструкторе толуола и бензола из сайта загрязнения содержится ряд кодирующих хлорбензоат диоксигеназу и дигидродиол дегидрогеназу катаболических генов mcbFAB, которые по отдельности были идентифицированы в ряде других штаммов-деструкторов из того же сайта. Данный факт свидетельствует о рекомбинации генов и формировании ими большого генного кластера, а также переносе как отдельных генов, так и образованного ими кластера в данной бактериальной популяции.

Де Рор с соавт. (De Rore et al., 1994) сосредоточили внимание на изучении переноса в загрязненной бифенилом песчаной почве плазмиды антибиотикорезистентности RP4::Tn4371, в которую были встроены гены катаболизма бифенила и 4-хлорбифенила. Несмотря на то, что донорный штамм *Enterobacter agglomerans* DMK3 обнаруживали в почве только в течение первых трех дней, плазмида переносилась в аборигенные почвенные бактерии. Рост трансконъюгантов

выше детектируемого уровня требовал наличия бифенила, т.е. селективного давления. Трансконъюгантные клоны относились к разным видам грамотрицательных бактерий, которые определили как *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas corrugata* и *Comamonas* sp., причем для данных родов была впервые показана экспрессия генов бифенила.

Фохт с соавт. (Focht et al., 1996) для того, чтобы показать перенос катаболических генов, интродуцировали штамм *Pseudomonas aeruginosa* JB2, деструктор хлорбензоата, в нестерильную почву с аборигенными деструкторами бифенила. Аборигенные штаммы – деструкторы бензоатов в почве отсутствовали. Количество бактерий, утилизировавших бифенил и 2-хлорбензоат, росло со временем в инокулированной почве, и соответствовало динамике численности деструкторов бифенила. Приобретение рекомбинантными штаммами способности утилизировать бифенил свидетельствовало о переносе *bph*-генов в интродуцированный реципиент, способный утилизировать катехол, из аборигенных деструкторов бифенила.

В литературе представлено несколько работ американской группы исследователей, касающихся переноса плазмид биодеградации нафталина и фенантрена. В одной из первых работ (Herrick et al., 1997) учеными изучалась возможность горизонтального переноса природных плазмид биодеградации нафталина в открытой почве. С этой целью плазмидную ДНК из почвенных аборигенных штаммов-деструкторов гибридизовали с геном *nah*Ac и затем проверяли идентичность отсеквенированной последовательности из 373 п.н. гена *nah*Ac. Было показано, что ген *nah*Ac из шести случайно выбранных почвенных штаммов был идентичным и отличался от гена седьмого штамма одним нуклеотидом. На основании идентичности плазмидного гена *nah*Ac, выделенного из различных почвенных штаммов-деструкторов, было сделано предположение о возможности горизонтального переноса плазмид биодеградации в открытой почве. Таким образом, существование высококонсервативного плазмидного гена *nah*Ac среди филогенетически разных бактерий обеспечило доказательство горизонтального переноса генов *in situ* в сайтах, загрязненных каменноугольным дегтем.

Цель работы Стюарта-Кейла с соавт. (Stuart-Keil et al., 1998) заключалась в определении возможного механизма горизонтального переноса *nah*Ac гена in situ, для чего идентифицировали и охарактеризовали плазмиды биодеградации нафталина разного размера из почвенных деструкторов. Скрещиваниями на фильтрах между изолированными из почвы бактериями была выявлена трансмиссивность катаболических плазмид. Анализ ПДРФ-профилей бактериальной ДНК показал, что

катаболические плазмиды из 12 выделенных из одного сайта штаммов близки друг другу и к плазмиде pDTG1 штамма *P. putida* NCIB9816-4, который был выделен несколько десятилетий назад в Бангоре (Уэльс). Две разные, но сходные катаболические плазмиды были выделены непосредственно из микробного сообщества загрязненного сайта скрещиванием на фильтрах с использованием бесплазмидного рифампицин-устойчивого почвенного штамма в качестве реципиента, выделенного из сайта. ПДРФ-профили и гибридизация по Саузерну показали, что обе выделенные из почвы плазмиды, как и плазмиды из изолятов, были близкородственны плазмиде pDTG1.

Хонсток с соавт. (Hohnstock et al., 2000) исследовали перенос плазмид биодеградации нафталина между аборигенными донорными штаммами и вносимыми реципиентами в почве в лабораторных условиях и in situ с добавлением нафталина и без него. Процесс деструкции нафталина в ходе эксперимента не изучали.

Уилсон с соавт. (Wilson et al., 2003) провели работу, сходную с работой Херрика с соавт. (Herrick et al, 1997), заключавшуюся в определении возможности горизонтального переноса *phn*Ac-генов среди микроорганизмов почвенного сообщества. Частичные последовательности *phn*Ac–генов и генов 16S рРНК были получены из восьми изолятов в пяти из шести фенотипических групп, идентифицированных по профилю потребляемых субстратов. Сравнение последовательностей генов 16S рРНК выявило большее разнообразие по сравнению с *phn*Ac-последовательностями. Таким образом, таксономически разные хозяева содержат высококонсервативный ген, что является доказательством его горизонтального переноса среди микробного сообщества.

Исследованию переноса катаболических плазмид в жидких и полужидких средах посвящено ряд работ. Раватн с соавт. (Ravatn et al., 1998) при изучении переноса генного элемента *clc*, кодирующего деструкцию хлоркатехола, и биодеградацию 3-хлорбензоата и хлорбензолов (монохлорбензол и 1,4-дихлорбензол) в активном иле, в котором также присутствовал толуол, зафиксировали межвидовой перенос *clc*-гена.

Нюссляйн с соавт. (Nüβlein et al., 1992) опубликовали работу, посвященную переносу плазмид деградации 3-хлорбензоата, 4-метилбензоата и 4-этилбензоата бактериями-деструкторами в активном иле. Плазмида pFRC20P содержала гены орто-пути деградации 3-хлорбензоата и 4-метилбензоата, pWW0-EB62 представляла собой производное TOL-плазмиды с встроенными генами деструкции 4-этилбензоата. В результате был показан перенос плазмид в бесплазмидный штамм *P. putida* UWC1.

Фултorп и Виндхам (Fulthorpe and Wyndham, 1992) для исследования переноса плазмид в аборигенные микроорганизмы использовали несколько проточных биореакторов, содержащих по отдельности 3-хлорбензоат, 4-хлоранилин, 3-хлорбифенил, 2,4-дихлорфеноксиацетат. В работе Кристенсена с соавт. (Christensen et al., 1998) конъюгационный перенос TOL-плазмиды pWW0 исследован в микробном сообществе биопленки проточной камеры, участвовавшем в деградации бензилового спирта. Сообщество состояло из трех видов бактерий: *P. putida* RI, *Acinetobacter* sp. C6 и неидентифицированного изолята D8. Было показано, что только штамм *P. putida* RI был реципиентом TOL-плазмиды.

Большой интерес представляет работа Хилл с соавт. (Hill et al., 1994), в которой представлены результаты по горизонтальному переносу катаболической плазмиды pD10, кодирующей деградацию 3-хлорбензоата и устойчивость к канамицину, между микроорганизмами в водных обрастаниях – эпилитоне. Работа Латхи и Лалитакумари (Latha and Lalithakumari, 2001) посвящена исследованию переноса катаболической плазмиды pHCL из штамма-донора *P. putida* HC1 в аборигенные, выделенные из моря, морские бактерии-облигатные галофилы (*Micrococcus* sp., *Micrococcus luteus* и *Micrococcus varians*) in vitro и in situ (стерильная морская вода без поллютанта). Данная плазмида имела размер 140 т.п.н. и несла гены катаболизма некоторых парафинов и ароматических углеводородов.

Известно, что поверхность листьев растений является природным фильтром, собирающим пыль, включающую в себя неорганические и органические соединения, а также микроорганизмы. Аккумулирующиеся на растениях тяжелые металлы и высокомолекулярные углеводороды, содержащиеся в остатках несгоревшего топлива и промышленных выбросах, могут оказывать значительное селективное давление. Известна лишь одна работа (Normander et al., 1998), касающаяся горизонтального переноса катаболической TOL-плазмиды между микроорганизмами в филлосфере фасоли обыкновенной. Данными исследователями был впервые показан перенос катаболических плазмид на поверхности листьев. Ризосфера (корни растений с прилегающей к ним почвой) способствует микробной активности, поскольку выделяет в почву растительные метаболиты. Показано, что перенос плазмид в ризосфере более эффективен (Kroer et al., 1998). Однако, Саранд с соавт. (Sarand et al., 2000), проводившие опыты в модельных системах с микоризосферной (с саженцами сосны и гифами гриба *Suillus bovinus*) и обычной почвой, показали, что в течение длительного эксперимента в селективных условиях количество образуемых трансконъюгантов различается незначительно.

3.2 Мониторинг бактериальных штаммов (доноров, реципиентов и трансконъюгантов) и процесса переноса катаболических плазмид

Используемые в экспериментах по изучению плазмидного переноса подходы можно разделить на две группы – прямые и косвенные. К первым относят методы (обычно микробиологические), позволяющие быстро, путем одной-двух процедур идентифицировать исследуемый признак (свойство), плазмидный или хромосомный, например, способность к росту на среде с ксенобиотиком, антибиотикорезистентность, устойчивость к тяжелым металлам. Ко вторым относят более длительные и многоэтапные способы, например, такие как ПЦР с праймерами, специфичными для хромосомных или плазмидных генов, и гибридизация ДНК с ДНК-зондом.

Как наиболее простой признак, позволяющий отличить трансконъюгантные клоны от доноров, ряд авторов в числе прочих свойств использовали морфологию колоний для мониторинга бактерий-деструкторов 2,2-дихлорпропионата (Brokamp, Schmidt, 1991), 2,5-дихлорбензоата (Crowley et al., 1996) и 2,4-дихлорфеноксиацетата (DiGiovanni et al., 1996) с применением дифференциально-диагностических сред. Ауксотрофность донорного штамма упрощает изоляцию трансконъюгантов и слежение за донором. Так, группа Е. Топ (Top et al., 1999; Dejonghe et al., 2000) использовала в качестве донора ауксотрофный по лейцину, изолейцину и валину штамм *P. putida* UWC3(pEMT1k), а Де Липтхе с соавт. (De Lipthay et al., 2001) – ауксотрофный штамм *E. coli* HB101(pRO103).

Для удобства визуализации штаммов широко используется флюоресценция и люминесценция. Краули с соавт. (Crowley et al., 1996) целенаправленно трансформировали донора *Pseudomonas fluorescens* 2-79 RLD маркером Tn7-*lux*CDABE (последний является опероном, кодирующим люциферазу, белок люминесценции) для простоты идентификации. Трансконъюганты не были способны к свечению. Естественная флюоресценция *Pseudomonas fluorescens* C5t(pJP4) облегчила идентификацию данного донора на среде Кинга Б (Daane et al., 1996). Тот же штамм *Pseudomonas fluorescens* C5t, но бесплазмидный, был использован ими в качестве реципиента в другой работе (Daane et al., 1997). Трансконъюгантные клоны данного штамма также отбирали на среде Кинга Б. Дейонге с соавт (Dejonghe et al., 2000) учитывали донора *P. putida* UWC3 на среде МКВ, на которой штамм флюоресцировал. В другой работе (Christensen et al., 1998) была сконструирована система штаммов и плазмиды pWW0, меченной геном *gfpmut3b*, для

непосредственного слежения за образованием трансконъюгантов под микроскопом в УФ-свете по зеленой флюоресценции Gfp-белка.

Иногда для выявления штаммов-деструкторов применяются индикаторные среды. Так, реципиентный штамм *P. fluorescens* R2F, получивший плазмиду с генами галидогидролазы галоалкановой кислоты, учитывали на pH-индикаторном агаре (Brokamp and Schmidt, 1991). Ньюби и Пеппер (Newby and Pepper, 2002) подсчитывали колонии донора и трансконъюгантов на чашках с 2,4-Д и агаром Эндо, содержавшем эозин В и метиленовый синий. Клетки микроорганизмов *Burkholderia, Pseudomonas* (Newby et al., 2000b), Ralstonia (Newby et al., 2000a) минерализовавшие 2,4-Д, формировали темно-пурпурные колонии в зависимости от pH, а клетки *E. coli* ATCC15224 кроме пурпурного цвета имели металлическое зеленое свечение. Дейонге с соавт. (Dejonghe et al., 2000) использовали минеральную среду ММО с 2,4-дихлорфеноксиацетатом и 5-бром-4-хор-3-индолил-βД-галактопиранозидом, на которой колонии трансконъюгантов приобретали синюю окраску.

Антибиотикорезистентность наряду с морфологией колоний широко используется микробиологами в различных экспериментах, в том числе по исследованию переноса плазмид устойчивости к тяжелым металлам, резистентности и биодеградации. Часто используются спонтанные мутанты, получаемые при культивировании штамма в среде, содержащей антибиотик рифампицин (Daane et al., 1996; Dejonghe et al., 2000; Top et al., 1999; Christensen et al., 1998; Sarand et al., 2000; Brokamp and Schmidt, 1991; Nüβlein et al., 1992), стрептомицин (Crowley et al., 1996; Fulthorpe and Wyndham, 1992; De Lipthay et al., 2001), налидиксовую кислоту (Top et al., 1998; Christensen et al., 1998) и тетрациклин (Normander et al., 1998).

Кроме того, в опытах часто используют множественную антибиотикорезистентность для мониторинга бактерий (Latha and Lalithakumari, 2001; Daane et al., 1997; Hill et al., 1994).

Плазмидные маркеры резистентности

В работе с плазмидами pEMT1k и pEMT3k, меченными miniTn5Km1, для селекции трансконъюгантов и/или донора использовали устойчивость к канамицину (Top et al., 1998; 1999). Дейонге с соавт. (Dejonghe et al., 2000) использовали меченные транспозоном miniTn5 KmlacZ плазмиды pEMT1::lacZ и pJP4::lacZ. Для отслеживания донора с плазмидой и трансконъюгантов в среду добавляли канамицин. Ген резистентности к тетрациклину в составе плазмиды pRO103 позволил использовать тетрациклин для изоляции донора E. coli HB101(pRO103) и трансконъюгантов (De

Lipthay et al., 2001). В работе Рамос-Гонзалес с соавт. (Ramos-Gonzalez et al., 1991) по исследованию переноса трех плазмид (pWW0-EB62, pWW0-EB62K, pWW0-EB62T) последние две несли гены резистентности к канамицину и тетрациклину, соответственно, причем данные антибиотики добавляли в селективную среду для селекции и доноров, и трансконъюгантов. Меченые варианты плазмиды pWW0 – pWW0::Km (Sarand et al., 2000) и pWW0gfpmut3b (Christensen et al., 1998; Normander et al., 1998) – были использованы для мониторинга трансконъюгантов. Гены антибиотикорезистентности (тетрациклин, ампициллин и канамицин), находились в составе плазмиды RP4::Tn4371, как и катаболические гены, что упрощало выделение трансконъюгантов (De Rore et al., 1994b).

В нескольких работах доноры и трансконъюганты подсчитывали на среде с добавлением солей ртути, причем гены резистентности к ртути находились в составе плазмид (Neilson et al., 1994; DiGiovanni et al., 1996; Daane et al., 1996; 1997; Hill et al., 1994).

Визуализация плазмид, ПЦР и гибридизация

Иногда проводят скрининг трансконъюгантов, чтобы убедиться в наличии в них плазмид (Neilson et al., 1994; DiGiovanni et al., 1996; Newby et al., 2000a,b; Newby and Pepper, 2002; Hill et al., 1994; Dejonghe et al., 2000; Latha and Lalithakumari, 2001). В некоторых исследованиях выделенную плазмидную ДНК подвергали гидролизу эндонуклеазами рестрикции, после чего сравнивали профили плазмид, выделенных из трансконъюгантов с профилем плазмид из донорного штамма (Brokamp and Schmidt, 1991; Top et al., 1999; de Lipthay et al., 2001). В некоторых случаях осуществляли обратный перенос плазмид из трансконъюгантов в подходящий реципиент: *E. coli* Cm330 в работах группы E. Топ (Top et al., 1998, 1999) и *E. coli* HB101 в работе Даане с соавт. (Daane et al., 1997).

Для того, чтобы получить дополнительное подтверждение присутствия катаболического плазмидного гена в трансконъюгантных клонах, используют также методы ПЦР и гибридизации (Neilson et al., 1994; DiGiovanni et al., 1996; Newby et al., 2000a,b; Newby and Pepper, 2002).

В ряде работ (Brokamp and Schmidt, 1991; Nüβlein et al., 1992; Daane et al., 1996; 1997) осуществляли гибридизацию колоний трансконъюгантов с зондами, полученными из плазмид – pFL40, pFRC20P и pLD1 (содержала *mer*-ген, кодирующий 4-метил-2-энелактон изомеразу, как и плазмида pJP4). Раватн с соавт. (Ravatn et al., 1998) наличие в трансконъюгантах генного модуля clc, кодирующего деградацию

хлоркатехола, проверяли гибридизацией тотальной ДНК с зондом *clc*RAB по Саузерну. Фултorп и Виндхам (Fulthorpe and Wyndham, 1992), чтобы показать наличие катаболических генов в трансконъюгантах, проводили гибридизацию рестрицированной тотальной и плазмидной ДНК с зондом E11, который перекрывает последовательность IS1071 и катаболические гены транспозона Tn5721. Перенос гена *tfd*A в трансконъюганты подтверждали гибридизацией плазмидных препаратов с зондом из плазмиды pKJS32, содержащей ген *tfd*A (de Lipthay et al., 2001).

Мониторинг переноса плазмид с использованием селективных катаболических признаков

Катаболические плазмиды, как правило, сообщают клетке-хозяину способность утилизировать какой-либо субстрат, что позволяет проводить мониторинг переноса плазмид с использованием селективных сред (Brokamp and Schmidt, 1991; Crowley et al., 1996; Top et al., 1998; 1999; Dejonghe et al., 2000; Focht et al., 1996; De Rore et al., 1994b; Ramos-Gonzalez et al., 1991; Sarand et al., 2000; Fulthorpe and Wyndham, 1992)

Косвенный мониторинг переноса катаболических плазмид

Ряд авторов (Ka and Tiedje, 1994; Herrick et al., 1997; Stuart-Keil et al., 1997; Wilson et al., 2003) для доказательства возможности переноса катаболических плазмид в почве использовали косвенные методы. Исследователи выделяли из почвы одного участка несколько различных штаммов, содержащих катаболические плазмиды, после чего сравнивали филогенетическое различие штаммов и степень отличия плазмид по последовательности катаболического гена (пути биодеградации 2,4-дихлорфеноксиацетата – ген *tfd*A (Ka and Tiedje, 1994), нафталина – ген *nah*Ac (Herrick et al., 1997; Stuart-Keil et al., 1997), фенантрена – ген *phn*Ac (Wilson et al., 2003). Кроме того, для подтверждения идентичности исследуемых плазмид сравнивали рестрикционные профили плазмид и проводили гибридизацию фрагментов различных плазмид между собой (Ka and Tiedje, 1994; Stuart-Keil et al., 1997), либо осуществляли гибридизацию плазмидной ДНК с катаболическими генами, а также секвенировали и сравнивали нуклеотидные последовательности катаболических генов из разных плазмид (Herrick et al., 1997; Wilson et al., 2003).

3.3 Факторы, влияющие на перенос катаболических плазмид и деградацию поллютантов

Условия в природных биотопах часто гетерогенны и динамичны. Ключевые биотические и абиотические факторы, которые влияют на жизнедеятельность живых организмов, как правило, очень разнообразны: стерильность/нестерильность среды, тип среды (почва, грунт, морская или пресная вода и т.д.), наличие/отсутствие селективного пресса и питательных веществ, температура, влажность, соленость, значения pH и другие. В природе жизнедеятельность микроорганизмов определяется многими факторами, поэтому создание экспериментальных условий, в которых возможно изучение воздействия единичного фактора, является достаточно трудной, а иногда и неосуществимой задачей.

3.3.1 Наличие селективного давления

В ряде работ было показано, что присутствие загрязнителя в конкретном участке способствует горизонтальному переносу плазмид и генов, контролирующих его деструкцию. Обладающая катаболическими генами клетка-хозяин имеет очевидное преимущество перед остальными микроорганизмами, поскольку способность расщеплять поллютант играет роль защитного механизма и обеспечивает микроорганизм дополнительным источником углерода и энергии.

Брокамп и Шмидт (Brokamp and Schmidt, 1991) изучали перенос плазмид биодеградации 2,2-дихлорпропионата в стерильной и нестерильной почве в условиях селективного пресса. Ньюби и Пеппер (Newby and Pepper, 2000) наиболее высокую численность трансконъюгантов наблюдали в колонках с протоком раствора 2,4-Д, вероятно, вследствие задержки 2,4-Д в почве и наличия селективного пресса в отношении плазмидного переноса и роста трансконъюгантов. Горизонтальный перенос плазмид возможен и в неселективных условиях. Так, Нейлсон с соавт. (Neilson et al., 1994) зарегистрировали перенос деградативной плазмиды pJP4 из R. eutropha в Variovorax sp. в почве как при наличии 2,4-дихлорфеноксиацетата, так и без него.

В работе финских и эстонских ученых (Sarand et al., 2000) аборигенные трансконъюганты с плазмидой pWW0::Km были найдены только после регулярной обработки почвы раствором мета-толуата в микоризосферной и обычной почве. Количество обнаруженных трансконъюгантов в почве с 0,5% содержанием поллютанта было на порядок больше по сравнению с почвой, содержащей 0,1% мета-

толуата. Таким образом, наличие селективного пресса повышает частоту переноса катаболических плазмид.

Положительное влияние загрязнителей на перенос катаболических плазмид отметили также Фултorп и Виндхам (Fulthorpe and Wyndham, 1992), которые исследовали влияние различных загрязнителей, и, кроме того, разных концентраций одного из них, 4-хлоранилина, на частоту возникновения в воде и осадках трансконъюгантов. Нюссляйн с соавт. (Nüβlein et al., 1992) показали, что селективное давление оказывает эффект на перенос плазмид, как и выбор плазмиды.

Таким образом, наличие селективного давления, как правило, повышает частоту конъюгационного переноса катаболических плазмид и численность трансконъюгантов в различных условиях.

3.3.2 Влияние типа почвы на перенос плазмид

Топ с соавт. (Top et al., 1998) изучали влияние различных типов почв при наличии 2,4-Д (в концентрации 0,1 г/кг почвы) на количество образуемых трансконъюгантов R. eutropha JMP134 при переносе плазмид pEMT1k и pEMT3k из донора E. coli X11-Blue. Показано, что в песчаной почве количество трансконъюгантов достигало 107 КОЕ/г почвы в случае плазмиды pEMT1k и 106 КОЕ/г почвы в случае с плазмидой pEMT3k. В этой почве образование большого количества 2,4-Д деградирующих трансконъюгантов обеспечивало более быструю деструкцию 2,4-Д по сравнению с контролем. В необработанной загрязнителем почве были найдены только трансконъюганты с плазмидой pEMT1k в количестве 103 КОЕ/г почвы. Высокое количество трансконъюгантов с плазмидой pEMT1k было найдено в лесной почве, куда внесли 2,4-Д. Однако, в отличие от песчаной в лесной почве не было обнаружено трансконъюгантов с плазмидой pEMT3k, а перенос pEMT1k в аборигенные бактерии не смог обеспечить более высокую скорость снижения загрязнителя, что могло быть результатом эффективного потребления 2,4-Д аборигенными деструкторами, присутствующими в лесной почве.

Ньюби с соавт. (Newby et al., 2000) также показали, что состав почвы и наличие поллютанта, в разных количествах добавленного в почву, влияют на процесс горизонтального переноса катаболических плазмид.

Обнаружено, что на межвидовой перенос плазмиды pWW0-EB62 из *P. putida* в почвенные аборигенные псевдомонады влияли тип использованной почвы, исходное количество инокулята и наличие химикатов (Ramos-Gonzalez et al., 1991).

3.3.3 Наличие питательных веществ

Группа Е. Топ (Dejonghe et al., 2001; Top et al., 2000) осуществила эксперименты по переносу плазмид биодеградации pEMT1k и pJP4 и деструкции 2,4-дихлорфеноксиацетата в почвенных горизонтах: А (0-30 см) и В (30-60 см). Плазмидный перенос и деструкция 2,4-Д отмечены в почве без и с добавлением питательных веществ. Тем не менее, инокуляция донора в почву горизонта В без питательных веществ приводила к полной деструкции 2,4-Д в течение 19 дней (нестерильный контроль – за 89 дней). Однако, в почве без питательных веществ донор *P. putida* UWC3 быстро отмирал, поэтому основная роль в деградации 2,4-Д принадлежала трансконъюгантам. При добавлении питательных веществ донор с той или иной плазмидой утилизировал 2,4-Д совместно с трансконъюгантами. При этом убыль 2,4-Д происходила за 14 дней. Частота переноса не зависела от плазмиды, почвенного горизонта и наличия питательных веществ.

Хонсток с соавт. (Hohnstock et al., 2000) изучали влияние нафталина, а также добавления в почву биогенных веществ на перенос плазмид биодеградации нафталина. В лабораторных условиях было сделано два эксперимента. В первом опыте оценивали эффект добавления источников углерода (LB-бульон в одном случае и LB-бульон с нафталином во втором случае). Реципиентный неидентифицированный штамм Cg21.CR (рифампицинустойчивый мутант) добавляли в количестве 10^6 КОЕ/г осадков, донорами катаболических плазмид служили аборигенные микроорганизмы. Трансконъюганты были обнаружены только во втором случае после 5 дней инкубации. Во втором эксперименте исследовали влияние продолжительности инкубации и наличия нафталина на частоту конъюгации и выживаемость реципиентов. В данном опыте концентрацию реципиента Cg21.CR увеличили до 10^9 КОЕ/г почвы. Было показано, что нафталин не оказывает положительного эффекта на выживаемость реципиентов; тем не менее, удалось выделить 19 трансконъюгантных штаммов после 14 суток эксперимента.

Далее был проведен опыт in situ, чтобы проверить влияние факторов, которые, как было показано в лабораторных условиях, стимулируют перенос плазмид. Реципиентов Cg21.CR и Cg1.CR вносили в отдельные цилиндры с почвой в концентрации 10^7 КОЕ/г с добавлением нафталина и без него. Кроме того, был вариант, когда в цилиндр с реципиентомCg21.CR добавили донора Cg21 для оценки влияния донорной популяции на перенос. В другом варианте вносили аборигенные доноры – деструкторы нафталина, которые предварительно культивировали на

нафталине. Только после того, когда в цилиндр с реципиентом Cg21.CR, где присутствовал нафталин, повторно внесли донора Cg21 до концентрации10^7 КОЕ/г почвы, удалось выделить единственный трансконъюгантный клон, что может быть следствием низкой частоты конъюгационного переноса в нестерильной почве.

Датские ученые (De Lipthay et al., 2001) показали положительный эффект селективного пресса на появление трансконъюгантов, причем в условиях добавления питательных веществ трансконъюганты были отмечены на 3 сутки, а без них – на 14 сутки. Наличие LB-бульона в почве существенно не ускоряло деструкцию феноксиацетата.

3.3.4 «Горячие пятна» переноса плазмид (участки с благоприятствующими плазмидному переносу условиями)

В работе Де Липтхе с соавт. (De Lipthay et al., 2001) был исследован перенос плазмиды pRO103 в нестерильных условиях между *E. coli* HB101(pRO103) и *Ralsronia eutropha* AEO106 в почве и в соломе. Пространство между гниющей растительностью и почвой («ресидьюсфера») являлось «горячим пятном» горизонтального переноса плазмиды, а наличие соломы ячменя увеличило частоту конъюгации в почвенных модельных системах в такой же степени, как и при наличии органических питательных веществ.

Кроме того, был изучен перенос плазмид между *E. coli* HB101(pRO103) и аборигенными деструкторами фенола в нестерильной почве без и с феноксиацетатом, в которую также поместили солому. Показано, что перенос шел только в соломе. Результаты переноса были сходными при наличии селективного пресса и без него (частота переноса ~5×10^{-5}).

3.3.5 Эффект влажности при горизонтальном переносе катаболических плазмид

Повышенная влажность оказывает положительное влияние на перенос плазмид. Нормандер с соавт. (Normander et al., 1998) в экспериментах с переносом производной TOL плазмиды в популяциях микроорганизмов на поверхности листьев фасоли показали, что при 100% влажности число трансконъюгантов через 24 ч соответствовало 1/3 от популяции реципиента (3×10^3 КОЕ/см^2). Плотность трансконъюгантов была в 500, 1200 и 8000 раз ниже при значениях относительной влажности 90, 80 и 55%, соответственно; при относительной влажности 25% трансконъюганты не были найдены.

Ньюби и Пеппер (Newby and Pepper, 2002) изучали влияние протока раствора 2,4-Д в почве на диссеминацию плазмиды pJP4. Было предположено, что распространение донора с протоком раствора 2,4-Д в сочетании с переносом плазмид способствует значительному распространению интродуцированных генов в загрязненной почве. На основании пониженной численности донора и реципиента авторы заключили, что в увлажняемой почве доноры и потенциальные реципиенты вымывались из колонки.

3.3.6 Температура как один из факторов, влияющих на плазмидный перенос

Важную роль при переносе плазмид играет температура, поскольку она определяет скорость метаболизма микроорганизмов. Хилл с соавт. (Hill et al., 1992) показали, что наибольшая частота мобилизации рекомбинантной катаболической плазмиды pD10 в штамме *P. putida*, содержащей гены деградации 3-хлорбензоата и устойчивости к канамицину, плазмидами резистентности к ртути, выделенными из речного эпилитона (обрастаний, образующихся на поверхности подводных предметов) наблюдалась при температуре от 15 до 40ºС.

3.3.7 Выбор донорного штамма

Ньюби с соавт. (Newby et al., 2000) выявили, что выбор донорного штамма играет некоторую роль при биоочистке загрязнений на примере *Ralstonia eutropha* JMP134 и *E.coli* D11. Оба интродуцированных донора оставались в почве и передавали плазмиду pJP4 в аборигенные реципиенты, хотя и в разной степени. При повторной обработке 2,4-Д усиленная деградация наблюдалась во всех системах, предполагая микробную адаптацию к 2,4-Д, причем деструкция поллютанта была наиболее быстрой в системе с *E. coli* D11. Также было показано, что кадмий, гены резистентности к которому находятся на плазмиде, не влиял на деградацию 2,4-Д и образование трансконъюгантов. Таким образом, выбор донора может быть ключевым фактором для биоаугментации.

3.3.8 Наличие филлосферы и ризосферы (листвы и корневой системы растений)

Отмечено, что присутствие в почве корней растущих растений оказывает положительный эффект на деструкцию загрязнителя (Crowley et al., 1996). После интродукции донорного штамма *P. fluorescens* 2-79 RLD с плазмидой pPB111, содержащей гены, кодирующие хлорбензоат-1,2-диоксигеназу, в почву с 10 мг/кг 2,5-дихлорбензоата загрязнитель утилизировался в почве с фасолью (*Phaseolus vulgaris*)

за период от 2 до 4 дней. В почве без растений его деградация происходила более чем за 7 дней. Численность деструкторов была сходной в почве с растениями и без них в течение 7 дней, далее их количество в почве без растений снижалось. Стабильность плазмид была также выше в ризосферной почве (90% донора в ней содержало плазмиды на 14 сутки по сравнению с 6% в почве без растений). Тем не менее, перенос плазмиды pPB111 наблюдали в обеих вариантах почв.

Саранд с соавт. (Sarand et al., 2000) обнаружили, что в присутствии поллютанта (мета-толуата) число трансконъюгантов в течение эксперимента в образцах микоризосферной и свободной контрольной почвы отличалось незначительно.

В работе Нормандер с соавт. (Normander et al., 1998) через 24 часа наибольшее количество содержащих производное TOL-плазмиды трансконъюгантов было найдено на поверхности листьев фасоли в эпидермальных полостях. В 5-10% из обследованных 300 устьиц (щелевидные поры на поверхности листьев растений, участвующие в газообмене и испарении воды) также были выявлены трансконъюганты. Несколько случайных трансконъюгантов нашли у основания трихомов (эпидермальные волоски или чешуйки на растениях). После эксперимента листья были непосредственно инокулированы трансконъюгантами, которые распространились по поверхности листьев сходным образом.

3.3.9 Присутствие почвенной биоты и перенос плазмид

Работ, посвященных влиянию почвенных животных на перенос плазмид, в литературе очень мало. В первой работе группа исследователей (Daane et al., 1996), изучавших влияние жизнедеятельности дождевых червей на перенос плазмид, показали, что черви способствовали переносу плазмиды pJP4. В отсутствие червей глубина почвы, на которой обнаруживали трансконъюгантов, была ограничена пятисантиметровым слоем от верха колонки, причем численность их составила 103 КОЕ/г почвы. Общая численность трансконъюгантов в колонках с червями видов *Lumbricus rubellus* и *Aporrectodea trapezoids* была 10^5 КОЕ/г почвы. Черви распространяли трансконъюгантов по всей колонке в зависимости от глубины ходов. Доноры и трансконъюганты также выделили из коконов и экскрементов червей. Во второй работе те же авторы показали (Daane et al., 1997), что наличие червей существенно увеличивало распространение в почве исходно разделенных в пространстве штаммов – доноров и реципиентов. Глубина обнаружения трансконъюгантов зависела от поведения и вида червя.

Глава 4. Хемотаксически активные микроорганизмы-деструкторы

Наличие специализированного двигательного аппарата и способности реагировать на постоянно изменяющиеся условия среды обитания посредством аэро-, осмо-, термо-, фито- и хемотаксиса существенно расширяет адаптационные возможности бактерий. Подавляющее большинство работ по исследованию подвижности и хемотаксиса выполнено на *Esherihia coli, Salmonella thyphimurium* и *Bacillus subtilis*. Расшифровка механизмов подвижности и хемотаксиса у разных групп почвенных бактерий важна для выяснения их роли в фитопатогенезе, в симбиотических и ассоциативных взаимоотношениях бактерий и растений (Кацы, 1996; Кацы 2007). Подвижность многих организмов определяется наличием жгутиков – внеклеточных органелл, способных к вращению (в отличие от невращающихся фимбрий, или пилей) и состоящих из трех основных частей: филамента, крюка и базального тела (Рис. 4).

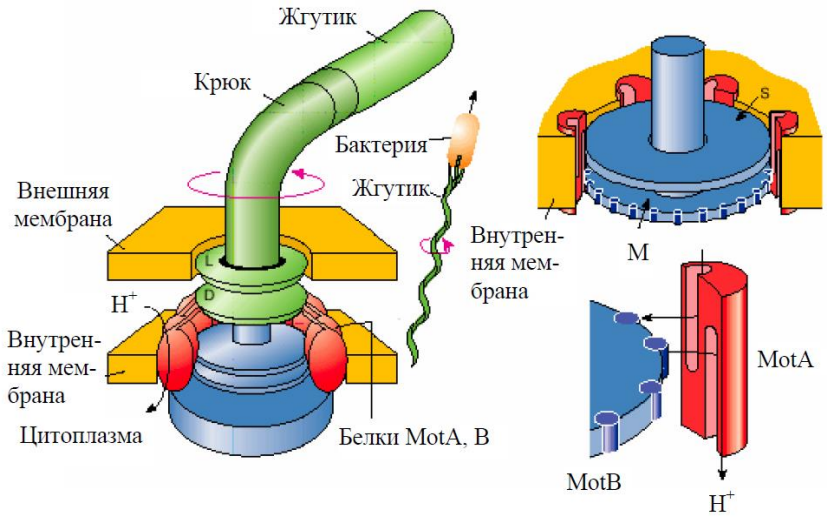


Рис.4. Схематическое изображение «электромотора», вращающего жгутики бактерий (по А. Н. Тихонову, 1999).

Некоторые бактерии «чувствуют» химический состав окружающей среды и используют эту информацию для перемещения к благоприятным зонам. В хемотаксическом ответе бактерий на хемоэффектор выделяют следующие основные этапы (Кацы, 1996):

1) воздействие эффектора на хеморецептор;

2) выработка сигнала и его трансдукция специфическими белками, генерализация сигналов, полученных от разных сенсоров;

3) восприятие сигнала вращательным аппаратом жгутика и поведенческий ответ клетки;

4) адаптация клетки в результате биохимической модификации белков.

Значительный интерес вызывает исследование хемотаксиса у клубеньковых бактерий (Parke et al., 1985; Caetano-Anolles et al., 1988; Aquilar et al., 1998; Kape et al., 1991; Barbour and Hattermann, 1992; Кацы, 1996; Курдищ и др., 2001; Caetano-Anolles et al., 2001), что обусловлено необходимостью инокуляции бобовых культур этими микроорганизмами. Бобово-ризобиальный симбиоз оказывает существенное влияние на рост и развитие бобовых культур (Патыка и др., 1997; Толкачев, 1997). Первым этапом его формирования является выделение корневых эксудатов, вызывающих целенаправленное движение к ним ризобий (Panyi et al., 1992; Pueppke et al., 1998). Это движение (хемотаксис), по-видимому, является одним из факторов, предопределяющих взаимодействие бактерий с растением-хозяином. Основы хемотаксиса освещены в ряде обзоров (Брезгунов и др., 1989; Кацы, 1996; Armitage and Schmitt, 1997). Показано, что на хемотаксис микроорганизмов влияют такие факторы, как плотность бактериальной популяции, pH и температура среды, а также ряд химических веществ (Adler 1973; Shonard et al., 1992; Zhulin and Armitage, 1993). Основные работы, посвященные хемотаксису ризобий, выполнены на клубеньковых бактериях (Karpati and Sik, 1992; Кириллова и др., 1984). Имеются отдельные сообщения о влиянии на хемотаксис некоторых химических веществ: ароматических соединений и флавоноидов (Parke et al., 1985; Kape et al., 1991).

Известно, что корневые выделения растений формируют градиенты различных соединений в почве. Выделяют следующие основные группы таких соединений: водорастворимые экссудаты (сахара, аминокислоты, органические кислоты, гормоны, витамины); секреты (например, энзимы и углеводсодержащие полимеры); лизаты клеток и газы (этилен, углекислый газ) (Кацы, 1996). Почвенные бактерии, которые могут чувствовать источник питательных веществ и двигаться по направлению к нему, имеют селективное преимущество, так как почвы обычно бедны питательными веществами. Подвижные и способные к хемотаксису симбиотические, фитопатогенные и ассоциативные бактерии, по-видимому, могут быстрее находить растения, чем неподвижные бактерии. Хемотаксис бактерий представляет единственный пример поведенческой реакции, для которой сравнительно подробно исследованы не только феноменология явления, но и молекулярные процессы, обеспечивающие его реализацию (Zhu et al., 1996). Интерес к нему вызван, с одной стороны, относительной простотой функциональной организации хемотаксической системы бактерий, а с другой - потенциальной возможностью его использования в

биотехнологии и при анализе некоторых экологических проблем (Брезгунов и др., 1989).

Вопросы функциональной и молекулярной организации системы хемотаксиса освещены в обзоре Брезгунова с соавторами (1989). Показано, что на проявление клетками двигательной активности большое влияние оказывают условия культивирования, химический состав, температура и вязкость среды. Считают, что источником энергии при вращении жгутиков служит трансмембранный электрохимический градиент протонов. Однако, механизм преобразования этого градиента в энергию жгутиков не установлен (Брезгунов и др., 1989). В настоящее время вопрос о молекулярной организации механизма хемотаксиса бактерий находится в стадии интенсивного изучения. Полученные данные позволили установить общую схему организации механизма управления движением, однако вопрос о внутриклеточном «сигнале хемотаксиса» окончательно еще не решен. Исследована зависимость подвижности и хемотаксиса двух штаммов *Bradyzhizobium japonicum* от ряда факторов окружающей среды. Хемотаксис у обоих штаммов возрастал при повышении концентрации аттрактанта (глюкозы) до 5,6x10-2 М (Курдиш и др., 2001). Оба показателя достигали максимальных величин у 2-3-суточных культур при нейтральных значениях pH. Наиболее высокая подвижность этих бактерий наблюдалась при 400°С. В тоже время наивысшие значения хемотаксиса данных микроорганизмов получены при 20-25°С. В средах с кислыми или щелочными pH, а также при низких температурах хемотаксис *B. japonicum* заметно снижался. Возможно, что неоптимальные значения этих факторов в полевых условиях могут лимитировать взаимодействие данных бактерий с корнями сои.

Исследования хемотаксиса *Bradyrhizobium japonicum* к ряду аминокислот, углеводов, многоатомных спиртов и органических кислот, к экстрактам семян сои (Чуйко и др., 2002) показали, что экстракты некоторых сортов сои («Чернобурая», «Бесклубеньковая») содержат репелленты, в то время как экстракты семян сорта «Марьяна» не проявляют подобных свойств. Это свидетельствует о наличии в семенах растений-хозяев эффекторов, которые, возможно, играют определенную роль на первичных этапах взаимодействия клубеньковых бактерий с бобовыми растениями. Показано также, что бактериям *B. japonicum* свойственен положительный хемотаксис ко многим аминокислотам, углеводам, органическим кислотам, многоатомным спиртам, и отрицательный хемотаксис – к лактозе. Интересно отметить, что этанол в концентрации 0,1 М и выше является репеллентом, а в более низких концентрациях – аттрактантом.

Хемотаксис бактерий к гидрофобным органическим соединениям, к которым относятся и полициклические ароматические углеводороды, и его роль в биоремедиационных процессах привлекает особое внимание исследователей в последние годы (Pandey and Jain, 2002). Оценен хемотаксис *Azospirillum species* к ароматическим субстратам (бензоат, 4-гидробензоат и катехол) капиллярным методом (Lopez-de-Victoria and Lovell, 1993). Наибольшая хемотаксическая реакция микроорганизмов была в интервале концентраций субстратов от 1 до 10 мМ. Бензоат был наиболее хемотаксически аттрактивным для азоспирилл. Способность азоспирилл чувствовать низкие концентрации ароматических соединений, которые могут быть в почве и ризосфере, может повысить их конкурентоспособность в окружающей среде. Показано, что бактерии *P. putida* G7 проявляли хемотаксис к нафталину (Grimm and Harwood, 1997; 1999). Выявлен рецепторный белок NahY, ответственный за хемотаксис к нафталину и его производным, и кодируемый соответствующим геном *nah*Y. Другие тестируемые полиароматические углеводороды не проявляли аттрактантных свойств для этого штамма (Grimm and Harwood, 1997). Способность бактерий распознавать ароматические углеводороды и двигаться в их направлении, возможно, является важнейшей начальной стадией процесса деградации ПАУ, однако это до сих пор не доказано. Гены, необходимые для полной деградации нафталина, обычно локализованы на крупных самотрансмиссивных катаболических плазмидах и, в случае катаболической плазмиды NAH7, показано присутствие таких генов на границе дефектных транспозонов. Благодаря установленным структурным характеристикам белка NahY, кодируемого плазмидными генами, можно заключить, что он, возможно, является хеморецептором для нафталина (Grimm and Harwood, 1999). Для подтверждения, данного предположения был сконструирован мутантный штамм *P. putida* G7 Y1 в котором 3′-конец гена *nah*Y, включая домен, который является высоко сохраняемым в белках-передатчиках, был перемещен с кассетой устойчивости к канамицину. Мутантный по гену *nah*Y штамм рос на нафталине с такой же скоростью, как и дикий штамм, однако, выросшие на нафталине клетки мутанта не реагировали на нафталин (как аттрактант). Хемотаксический дефект появился как специфичный к аттрактанту нафталину, так как мутант по гену *nah*Y имел тип хемотаксической реакции к сукцинату, бензоату, салицилату 4-гидроксибензоату такой же, как и у дикого штамма. Нестимулированное движение мутанта было таким же, как и у клеток дикого типа. Ни дикий тип, ни мутант не увеличивали скорости движения при ответной реакции на добавление в систему тестируемых аттрактантов. Дикий тип гена *nah*Y был перенесен в широкий круг

плазмид-хозяев, дополняя фенотип с хемотаксисом к нафталину штамма *P. putida* G7 Y1 посредством транспозона. Фенотип мутанта по гену *nah*Y и установленная аминокислотная последовательность белка NahY позволяют заключить, что этот белок вероятно функционирует посредством связи с нафталином или с родственными соединениями на их периплазматической стороне для инициации хемосенсорного сигнала по аналогии с бактериальными белками переносчиками. Такие белки хорошо изучены у *E. coli* и *S. typhimurium*, где они связывают аминокислоты или сахара и инициируют сенсорный сигнал трансдукции посредством изменения активности белка CheA, ассоциированного с гистидинкиназой. CheA –P белок регулятор ответа, имеющий сродство к фосфору, CheY - взаимодействует с белками, которые выступают в качестве вращательных «переключателей» в жгутике. Это приводит к изменению поведения и клетки мигрируют к хемоаттрактанту. Кластер генов, продуктами которых являются гомологичные пять из шести растворимых белков, необходимых для хемотаксиса у *E. coli*, были недавно идентифицированы в *P. putida*. Можно сделать вывод, что у этих двух штаммов процесс получения сенсорной информации, влияющей на хемотаксис, проходит по одинаковым путям. Белок NahY имеет сигнальный домен, возможный сайт метилирования и мембранную топологию типичную для хемотаксических белков-передатчиков. Однако, не показана степень его общей аминокислотной идентичности с другими белками хемотаксиса. Предположительно сенсорный домен в периплазме белка NahY, очевидно, изолирован, достаточно отдаленно связан с N-терминалом сенсорного домена трансдукторов и подобными им белками. Однако, особенности хеморецепторных функций белка NahY остаются неизученными. Например, мы все еще не знаем точно о том, что NahY «чувствует» и осуществляются ли эти функции в одиночку, или совместно с белком NahX. Исследователи пока не продемонстрировали хемотаксис к нафталину у штамма *P. putida*, который имел в составе своего генома *nah*Y на транспозоне, при отсутствии генов деградации. Можно предположить, что какой-то метаболит нафталина, в большей степени, чем сам нафталин, является хемоаттрактантом. В этом случае, такой метаболит является вероятным интермедиатом верхнего пути деградации нафталина, т.к. мутант по гену *nah*Y не является дефектным по хемотаксису в отношении салицилата, который является начальным соединением нижнего пути. Тот факт, что ген *nah*Y локализован на катаболической плазмиде NAH7 и обратная транскрипция его происходит совместно с генами деградации нафталина, свидетельствует о том, что хемотаксис может быть важным дополнением к процессу биодеградации. Наличие мутанта по гену *nah*Y

может способствовать бы дальнейшему изучению хемотаксиса к ароматическим углеводородам и его роли в их биодеградации в природных условиях.

Показано также, что существует «метаболизм независимый» и «метаболизм зависимый» хемотаксис (Pandey and Jain, 2002). Так, для *P. putida* PRS2000 3- и 4-хлорбензоат являлись аттрактантом, но деградации этих соединений указанной культурой не отмечалось. Для *P. putida* PRS2000 найдены гены, ответственные за хемотаксис к 4-хлорбензоату и биодеградацию ароматических кислот (Hardwood et al., 1994). Паралис с соавторами исследовали 5 подвижных штаммов бактерий (Parales, et al., 2000), проявляющих различную активность по отношению к ароматическим углеводородам (бензин, толуол) и различную способность определять и двигаться к загрязнителю. Три из них проявляли хемотаксическую активность к углеводородам, зависимую от индукции (предварительного роста на этом соединении). Оценен также хемотаксис у *P. putida* F1 к различным ароматическим углеводородам и хлорированным алифатическим соединениям. Экспериментально доказана способность почвенных бактерий двигаться в положительном градиенте концентраций толуола, бензола, трихлорэтилена, что может служить основанием для применения хемотаксически активных микроорганизмов в биоремедиации.

Таким образом, одним из механизмов, благодаря которому усиливается контакт между бактериями и загрязнителем, является хемотаксис. Хемотаксис обеспечивает подвижным бактериям два существенных преимущества по сравнению с неподвижными и не имеющими хемотаксического сродства: 1) более тесный контакт с загрязнителем и 2) направленное смещение микроорганизмов по градиенту загрязнителя. Показана роль хемотаксиса бактерий в их скоплении в ризосферной и корневой зоне растений, а также в пограничной зоне водной среды. Феномен бактериального хемотаксиса к загрязнителю и корневым выделениям растений и способность таких микроорганизмов к деградации ароматических соединений (Parales, Hardwood, 2002), могут быть использованы в биоремедиации. Хотя к настоящему времени достигнут определенный прогресс в изучении явления и механизма хемотаксиса микроорганизмов к загрязнителям и корневым экссудатам растений, до практического применения их в технологиях биоремедиации еще далеко. Несмотря на то, что такие процессы как биоремедиация и фиторемедиация загрязненных территорий, взаимодействие микроорганизмов и растений и механизм хемотаксиса бактерий в литературе описаны достаточно хорошо, однако в отношении микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти, ассоциированных с растениями, эти явления изучены пока недостаточно.

Глава 5. Виды и особенности синтеза биологических поверхностно-активных веществ

5.1 Классификация биологических поверхностно-активных веществ

К поверхностно-активным веществам (ПАВ) относят вещества, способные понижать поверхностное натяжение растворителя (Ланге, 2004). Под термином «биосурфактанты» (биологические ПАВ) принято понимать разнообразные поверхностно-активные вещества, синтезируемые микроорганизмами (Muthusamy et al., 2008). У биоПАВ имеется ряд преимуществ, благодаря которым интерес к их изучению возрастает с каждым годом:

— Высокая биоразлагаемость. В отличие от синтетических ПАВ, биосурфактанты легко разлагаются, что позволяет использовать их без нанесения вреда окружающей среде (Lima et al., 2011).

— Структурное и функциональное разнообразие даёт возможность подбирать биоПАВ с заданными свойствами для целевого применения (Desai and Banat, 1997).

— Сохранение высокой активности при экстремальных значениях температуры, солёности, pH (Abouseoud et al., 2008).

— Низкая токсичность и высокая биосовместимость делает перспективным использование биоПАВ в фармацевтической, пищевой, косметической промышленности (Desai and Banat, 1997; Gautam and Tyagi, 2006).

— Возможность получения из дешевого возобновляемого сырья (например, используя отходы пищевой промышленности) (Makkar and Cameotra, 2002; Maneerat and Songklanakarin, 2005).

За счёт вышеперечисленных качеств, биосурфактанты находят применение в самых разнообразных областях: биотехнология защиты окружающей среды, нефтедобывающая, нефтеперерабатывающая, пищевая и фармацевтическая промышленность, косметология и медицина(Klekner and Kosaric, 1993; Singh et al., 2007; Liu et al., 2004).

В отличие от синтетических ПАВ, которые принято классифицировать по типу полярной группы, биосурфактанты систематизируют на основании их химического строения с учётом рода, а иногда и вида микроорганизма, их продуцирующего (Desai, Banat, 1997). Как и синтетические ПАВ, биосурфактанты принято разделять на две большие группы: низкомолекулярные и полимерные. Однако более подробная классификация является достаточно сложной задачей. Во-первых, к биосурфактантам относят соединения более разнообразные и сложные по своему строению, чем

распространённые синтетические ПАВ. Во-вторых, микроорганизмы одного рода могу синтезировать биосурфактанты различных типов. Поэтому, даже зная род изучаемого микроорганизма, можно только предполагать, какой тип биосурфактанта он способен образовывать и способен ли вообще (Gautam and Tyagi, 2006). Кроме того, строение биоПАВ и их продуценты интенсивно изучаются в настоящее время, поэтому часто встречаются работы, посвящённые описанию новых, малоисследованных биосурфактантов, вследствие чего такие результаты не всегда учитывают при составлении классификаций. Например, общеизвестно, что микроорганизмы рода Rhodococcus синтезируют трегалозосодержащие гликолипиды. Однако недавно был обнаружен штамм Rhodococcus sp. TW53, являющийся эффективным продуцентом липопептидного биосурфактанта (Peng et al., 2008). В табл. 4 приведена общепринятая классификация биоПАВ, которую, тем не менее, не следует считать полной в силу перечисленных выше причин.

Табл. 4. Классификация распространённых биосурфактантов по химическому строению и роду микроорганизма-продуцента (Desai and Banat, 1997).

Тип биосурфактанта			Микроорганизмы-продуценты
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ	Гликолипиды	Рамнолипиды	*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* spp.
		Трегалолипиды	*Mycobacterium tuberculosis*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*., *Nocardia*, *Corynebacterium* spp.
		Софоролипиды	*Candida* (*Torulopsis*) spp.
	Липопептиды	Орнитин- и серинсодержащие	*Flavobacterium*, *Rhodopseudomonas*, *Serratia*, *Pseudomonas* spp.
		Сурфактин, грамицидин, полимиксин, лихенизин	*Bacillus* spp.
		Вискозин, путисолвин	*Pseudomonas* spp.
	Прочие	Жирные кислоты, фосфолипиды, триглицериды	*Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Candida*, *Penicillium*, *Aspergillus* spp.
ПОЛИМЕРНЫЕ	—	Эмульсан	*Acinetobacter venetianus* (*Acinetobacter calcoaceticus*)
		Аласан	*Acinetobacter radioresistens*
		Липосан	*Candida lipolytica*

5.2 Особенности строения и синтеза рамнолипидов и трегалолипидов

Микроорганизмы родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* относятся к наиболее изучаемым среди обладающих ярко выраженной углеводородокисляющей активностью. Особое внимание уделяется синтезируемым ими биосурфактантам гликолипидной природы: рамно- и трегалолипидам. Выявление закономерностей образования, особенностей строения и физико-химических свойств этих веществ является целью многочисленных исследований в связи с высокой научной и практической ценностью этих знаний.

5.2.1 Рамнолипиды микроорганизмов рода *Pseudomonas*

К наиболее изучаемым среди биоПАВ относятся рамнолипиды — гликолипидные сурфактанты, продуцируемые псевдомонадами. Они состоят из углевода рамнопиранозы $C_6H_{12}O_5$ (6-дезокси-L-маннозы) и неразветлённых β-гидроксилированных жирных кислот. Отличительной структурной особенностью этих соединений является наличие гликозидной связи между сахаром и гидроксильной группой кислоты (Muthusamy et al., 2008).

Впервые образование такого рода соединений было обнаружено у *Pseudomonas pyocyanea* в 1946 г. при росте на глюкозе (Bergstrom et al., 1946). Было установлено, что в его состав входят молекулы рамнозы и остаток *β*-гидроксидекановой кислоты, однако, установить молярное соотношение углевода и жирной кислоты не удалось. Это было достигнуто в 1949 г. в работе Джарвиса и Джонсона (Jarvis, Johnson, 1949), показавшими, что при росте *P. aeruginosa* на глицерине образуется вещество, в котором *β*-гидроксидеканоил-*β*-гидроксидеканоат связан гликозидной связью с дирамнозилом (рис. 5). Позднее был определён тип связи между молекулами углеводов, которая оказалась гликозидной 2-1-связью (Edwards and Hayashi, 1965). Таким образом, первым веществом с установленной структурой стал рамнолипид, который принято сокращённо обозначать R2 (рамнолипид 2). Позднее, синтез такого же соединения был обнаружен у *P. aeruginosa* S7B1 как единственный рамнолипид, образуемый при культивировании с гексадеканом или смесью *н*-алканов C_{14}-C_{18} (Hisatsuka et al., 1971). Другой тип рамнолипида: L-*α*-рамнопиранозил-β-гидроксидеканоил-*β*-гидросидеканоат (R1 или рамнолипид 1), был выделен из культуральной жидкости *P. aeruginosa* KY 4025 (Itoh et al., 1971). Так как в молекуле присутствует только один фрагмент углевода, то такие соединения принято называть монорамнолипидами, а биосурфактанты типа R2 — дирамнолипидами (Lang and

Wullbrandt, 1999). В 1975 г. в своих работах Зилдатк с соавт. (Syldatk et al., 1985a, Syldatk et al., 1985b) при изучении *Pseudomonas* sp. DSM 2874 обнаружили биосурфактанты, сходные по структуре с R1 и R2, но имеющие только один остаток гидроксидекановой кислоты (R3 и R4, соответственно).

В 1976 г. Ямагучи с соавт. (Yamaguchi et al., 1976) описали гликолипидные структуры, которые были названы рамнолипиды А и В (Рис. 5). Они оказались подобны рамнолипидам 1 и 2, но были дополнительно ацилированы декан-2-еновой кислотой в положении 2' с образованием сложноэфирной связи. Рамнолипиды 1 и 2, метилированные по свободной карбоксильной группе, были основными продуктами, образуемыми P. aeruginosa 158 при культивировании на триптозно-соевой среде (Hirayama, Kato, 1982).

При дальнейшем изучении структур образуемых псевдомонадами рамнолипидов было установлено, что помимо C_{10}-жирных кислот в их состав могут входить многие другие. Впервые моно- и дирамнолипиды, содержащие помимо гидроксиденановой остатки *β*-гидроксилированных октановой, додекановой и додеценовой кислот, обнаружили Ренделл с соавт. в клинических изолятах *P. aeruginosa* при культивировании на глюкозе (Rendell et al., 1990). Общее число изомеров составило 14 соединений: 7 моно- и 7 дирамнолипидов, при этом все содержали два остатка кислот, то есть относились к типам 1 и 2, а доминирующим был деканоилдеканоат Rha-C_{10}-C_{10} (рамнолипид 2). Позднее было подтверждено существование таких соединений (Monteiro et al., 2007).

Дальнейшие исследования расширили список изомеров рамнолипидов, а также ЖК, которые могут входить в их состав. Дизель с соавт. (Deziel et al., 1999) смогли идентифицировать 28 соединений, продуцируемых штаммом *P. aeruginosa* 57RP при росте на манните или на нафталине. Один из изомеров содержал остаток ранее не обнаруженной кислоты – тетрадеценовой. Гюнтер с соавт. обнаружили рамнолипиды, в состав которых входит тетрадекановая кислота (Gunther et al., 2005). Полиненасыщенные кислоты $C_{8:2}$, $C_{12:2}$ и $C_{14:2}$ также могут входить в состав гликолипидов (Abalos et al., 2001, Guo et al., 2009). Всего к настоящему моменту найдено 46 различных изомеров и гомологов рамнолипидов, образуемых представителями рода *Pseudomonas* (Abdel-Mawgoud et al., 2010).

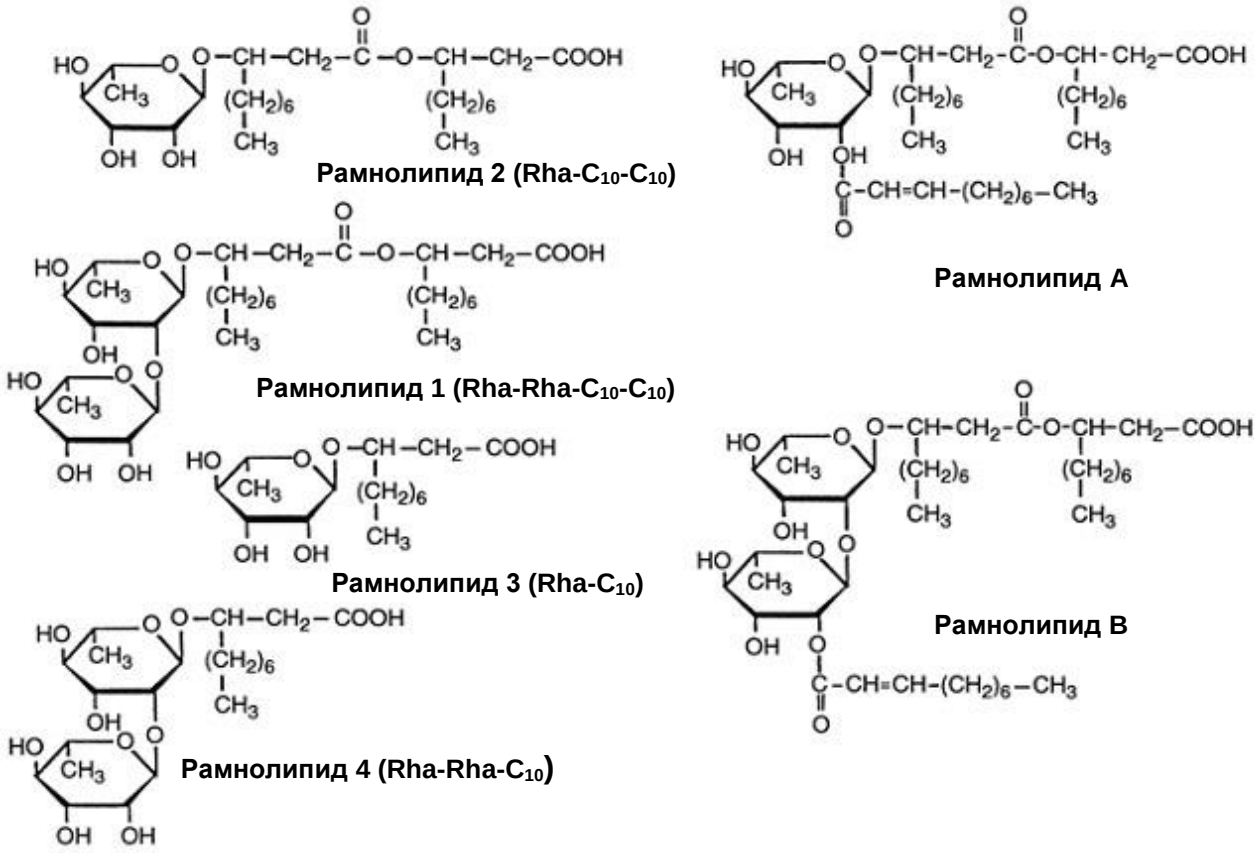


Рис. 5. Структура некоторых рамнолипидов (Lang, Wullbrandt, 1999).

5.2.2 Трегалолипиды микроорганизмов рода *Rhodococcus*

Для представителей рода *Rhodococcus* характерно образование поверхностно-активных веществ в ответ на присутствие в среде культивирования алканов. Эти ПАВ представляют собой гликолипиды, содержащие невосстанавливающий дисахарид трегалозу $C_{12}H_{22}O_{11}$ (α-D-глюкопиранозил-1,1-α-D-глюкопираноза), с которым сложноэфирными связями соединены жирные кислоты (Lang and Philp, 1998). Наиболее распространены α-разветвлённые β-гидроксилированные (миколовые) кислоты с суммарной длинной углеродной цепи от 20 до 90 атомов (Franzetti et al., 2010). Трегалолипиды также синтезируют представители родов *Corynebacterium*, *Mycobacterium* и *Nocardia* (Asselineau and Asselineau, 1978). Клеточносвязанные (эндо-тип) трегало-6,6'-димиколаты, известные как «корд-фактор», являются фактором патогенности туберкулёзных бактерий *Mycobacterium tuberculosis* (Sakaguchi et al., 2000).

Биосурфактанты эндо-типа были обнаружены при изучении штамма *R. erythropolis* DSM43215 (Rapp et al., 1979) (рис. 6). Липидные фрагменты были представлены миколовыми (3-гидрокси-2-алкилированными) кислотами с общей

формулой от $C_{32}H_{64}O_3$ до $C_{38}H_{76}O_3$, где $C_{34}H_{68}O_3$ и $C_{35}H_{70}O_3$ оказались доминирующими (Kretschmer et al., 1982). При росте штамма *Rhodococcus* sp. H13-A на гексадекане образовывались биосурфактанты экзо- и эндо-типов, представлявшие неионогенные липиды трегалозы с одним основным и десятью минорными компонентами (Singer and Finnerty, 1990). Основной компонент был идентифицирован как 2,3,4,6,2',3',4',6'-октаалканоилтрегалоза, а минорные – как ди-, тетра- и октаацилированные производные углевода.

Образование родококками гликолипидов экзо-типа, то есть не связанных с клеточной стенкой, а выделяемых в культуральную среду, было впервые показано в 1983 в работе Ристау и Вагнера (Ristau and Wagner, 1983). Их структура была подтверждена методами инфракрасной спектроскопии, ядерно-магнитного резонанса ^{1}H и ^{13}C, масс-спектрометрии и элементного анализа. В отличие от ранее изученных миколатов трегалозы, эти биоПАВ содержали остаток янтарной кислоты, так что одна карбоксильная группа не участвовала в образовании сложноэфирных связей, то есть, фактически, данные соединения относились к анионогенным ПАВ. Кроме этого, в гликолипиды входили остатки линейных ЖК, длина которых была значительно меньше миколовых и варьировалась от C_8 до C_{14}. Образование двух 2,3,4,2'-тетраэфиров трегалозы, содержащих один остаток янтарной и ещё три остатка декановой и октановой кислот, отмечено при культивировании микроорганизмов штамма *Rhodococcus* sp. MS11 с гексадеканом (Rapp and Gabriel-Jurgens, 2003). Методом масс-спектрометрии электронного спрея было установлено, что молекулярной массе 848 Да соответствует диоктаноил-деканоил, а массе 876 Да – октаноил-дидеканоил производные, хотя точное распределение ацильных радикалов не было установлено. Аналогичный состав биоПАВ обнаружили Тулева с соавт. (Tuleva, 2008) у *R. wratislaviensis* BN38, также при использовании гексадекана в качестве источника углерода и энергии. Эспуни с соавт. обнаружили сукциноилпроизводные трегалозы иного состава. Бактерии штамма *Rhodococcus* sp. 51T7 при росте на отходах машинного масла выделяли 2,3,4,2'-тетраэфиры трегалозы, в составе которых присутствовал сукциноил, а длина цепей остальных кислот варьировала от 7 до 11 (Espuny et al., 1995). Два анионных трегалолипида, содержащих два жирнокислотных остатка (C_{12}, C_{14} или C_{16}) и два (STL-1), либо один (STL-2) остаток янтарной кислоты, образовывали микроорганизмы штамма *Rhodococcus* sp. SD-74 при росте на гексадекане (Uchida et al., 1989) или глицерине (Tokumoto et al., 2009). Соединение STL-2 отличается отсутствием заместителя в положении C-2' и, соответственно, представляет собой триэфир.

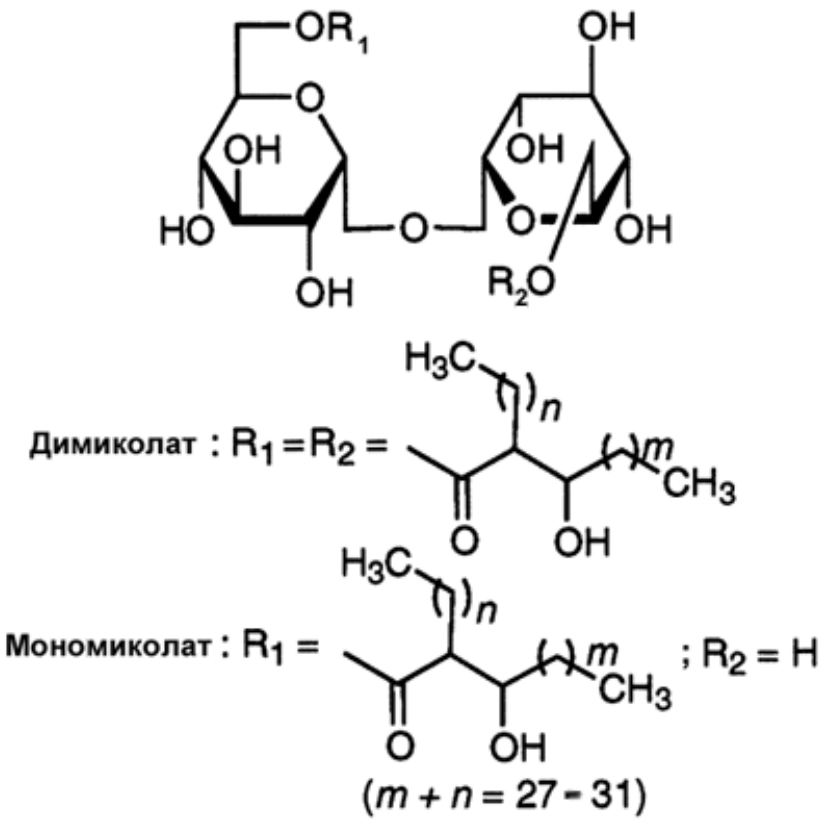


Рис. 6. Структура трегаломиколатов эндо-типа, образуемых R. erythropolis DCM43215 (Kretschmer et al., 1982).

Глава 6. Методы биоремедиации территорий, загрязнённых нефтью и нефтепродуктами

Нефть и нефтепродукты являются наиболее распространенным загрязнителем природных экосистем. К числу основных характеристик этого вида загрязнения можно отнести: органогенную природу, многокомпонентный состав, токсичность ряда составляющих, масштабность распространения, высокую миграционную способность (Рогозина и др., 2010). Низкие темпы самоочищения окружающей среды приводят к тому, что без проведения мероприятий по очистке площадь загрязнённых нефтью и нефтепродуктами территорий будет неуклонно расти. Существующие в настоящее время способы локализации и ликвидации разливов нефти и нефтепродуктов, а также переработки нефтяных загрязнений, образовавшихся как в результате аварийных разливов, так и вследствие сверхлимитного накопления отходов, можно достаточно условно подразделить на несколько групп:

1. Механические методы
2. Термические методы
3. Сорбционные методы

4. Физико-химические методы

5. Биологические методы

6. Фитомелиоративные методы

По мнению Ю.М. Матвеева (1995) среди методов очистки природных экосистем от нефтяного загрязнения могут быть выделены также агрохимический метод (внесение удобрений, известкование) и агротехнический метод (вспашка, использование растений, т.е. другими словами, фитомелиорация или фиторемедиация).

Ни один из перечисленных методов не позволяет полностью решить проблему очистки нефтезагрязнённой среды. Методы технической рекультивации в большинстве случаев позволяют собрать лишь часть нефти, либо значительно понизить концентрацию загрязнителя, однако не ликвидируют загрязнение полностью (Арчегова, 1997), а физико-химические и термические методы не рекомендуется использовать для рекультивации нефтезагрязнённых земель, так как они ведут к уничтожению плодородного слоя и накоплению токсикантов. Следует отметить, что биологические методы ремедиации считаются экономически более выгодными и более эффективными (http://www.pollutionissues.com/Na-Ph/Petroleum.html, 27-03-2011).

На заключительной стадии очистки почв и водных поверхностей при низких концентрациях нефти основную роль играет биологический фактор – активность микроорганизмов, участвующих в процессах трансформации, деградации и минерализации углеводородов. Для активизации микробиологических процессов самоочищения нефтезагрязнённых почв используются различные приёмы биоремедиации. Биоремедиация (от био и лат. remedio – лечение, восстановление) – использование живых организмов (бактерий, дрожжей, грибов, водорослей и растений) для детоксикации загрязняющих веществ (поллютантов) или снижения их концентрации в окружающей среде (Биотехнология защиты окружающей среды. Учебное пособие, ТулГУ, 2006). Стратегии, используемые микроорганизмами для деградации углеводородов нефти, включают синтез соответствующих ферментов, кометаболизм, перенос катаболических плазмид и продукцию биосурфактантов для повышения биодоступности гидрофобных субстратов (Balba, 2003; http://home.eng.iastate.edu/~tge/ce421-521/brubaker.pdf, retrieved on 27th Mar. 2011). Благодаря биоремедиации нормализуются природные процессы, а экологические показатели приближаются к исходному состоянию (до техногенного воздействия). Биоремедиация обеспечивает экономически выгодную, высокоспецифичную очистку,

приводящую к уменьшению концентрации как отдельного загрязнителя, так и смеси поллютантов. Препятствиями в достижении этой цели являются низкая температура, повышенная концентрация соли, низкое содержание питательных веществ, отсутствие или низкая деградативная активность природных микробных популяций (Вельков, 1995; Foght and McFarlane, 1999; Margesin and Schinner, 2001).

Существуют два подхода, основанные на использовании эндогенных или интродуцируемых микроорганизмов в местах загрязнения. Первый называется эндогенной биоремедиацией или биостимуляцией (intrinsic bioremediation) и предполагает активацию аборигенных микроорганизмов, адаптированных к конкретным условиям данной загрязнённой территории. Второй подход основан на внесении активных микроорганизмов–деструкторов в места загрязнения (in situ) и называется биоулучшением или интродукцией микроорганизмов-деструкторов, часто в составе биопрепаратов (bioaugmentation).

Агентство по защите окружающей среды США (U.S. EPA) дало такое определение веществам, применяемым в биоремедиации - «микробные культуры, ферменты или питательные вещества, добавление которых значительно увеличивает скорость биодеградации вредных веществ» (Nichols, 2001). Агенты для биоремедиации также классифицируются как вещества для биоаугментации и биостимуляции, основанные на двух основных подходах, применяемых в биоремедиации. Многие продукты для биоремедиации были предложены фирмами, которые их производили, особенно на протяжении 90-х годов 20-го века, когда биоремедиация популяризовалась как «завершающий раствор» для нефтяных разливов (Hoff, 1993).

Применяют также биоремедиацию *ex situ*, которая предполагает экскавацию и вывоз нефтезагрязнённой почвы с места загрязнения с последующей её утилизацией, а также on-site биоремедиацию, которая требует экскавации, но не дорогостоящего вывоза загрязнённых почв, и предполагает дальнейшую переработку загрязнённого материала непосредственно на месте аварии.

6.1 Активация аборигенных микроорганизмов (биостимуляция)

Известны два подхода к активации аборигенных микроорганизмов. Первый - биостимуляция *in situ* (биостимуляция в месте загрязнения). Этот подход основан на стимулировании роста природных (аборигенных) микроорганизмов, содержащихся в загрязненной почве и потенциально способных утилизировать загрязнитель, но не способных делать это эффективно из-за отсутствия полного набора пищевых

компонентов (недостаток соединений азота, фосфора, калия и др.) (Вельков, 1995), либо вследствие негативного воздействия условий внешней среды. Важнейшими факторами окружающей среды, влияющими на биодеградацию, являются температура, влажность, значения pH, содержание кислорода, тип почвы, наличие токсикантов, в том числе, тяжелых металлов (Thapa et al., 2012). Поэтому успех и эффективность биоремедиации в значительной степени зависят от создания оптимальных условий для микробного метаболизма поллютанта.

Второй подход - биостимуляция *in vitro* с последующей реинтродукцией аборигенных микроорганизмов в место загрязнения. Отличие этого подхода от вышеописанного в том, что биостимуляция аборигенных микроорганизмов загрязненной почвы или воды проводится в лабораторных или промышленных условиях (в биореакторах или в ферментерах). При этом в биореакторе обеспечивается преимущественный и избирательный рост тех микроорганизмов, которые способны наиболее эффективно утилизировать данный загрязнитель (Вельков, 1995).

В экосистемах большинства береговых линий, которые наиболее сильно загрязнены углеводородами, питательные вещества являются лимитирующим фактором в биодеградации нефти. Исключением является заболоченная территория. Если нефтепродукты проникают в заболоченную почву или собственно болото, то преобладающим механизмом, препятствующим очистке, является ограничение в доступе кислорода и влияние анаэробных зон. Теоретически, примерно 150 мг азота и 30 мг фосфора расходуется при превращении 1 г углеводорода в клеточную биомассу (Ron and Rosenberg, 2001). Следовательно, стехиометрическое соотношение C:N:P должно быть 100:5:1. Однако, другие исследователи полагают, что соотношение C:N:P как 100:10:4 оптимально для биоремедиации (Thapa et al., 2012). На практике это соотношение может варьировать довольно значительно.

Обычно для биостимуляции применяют водорастворимые питательные вещества, включающие минеральные соли (такие как KNO_3, $NaNO_3$, NH_4NO_3, K_2HPO4, $MgNH_4PO_4$), и различные коммерческие неорганические удобрения. Как правило, их применение в открытой окружающей среде осуществляется путём дождевания (распыскивания) растворов удобрений или разбрасывания сухих гранул. Этот подход эффективен для увеличения биодеградации нефти в полевых условиях. Одними из первых полевых испытаний с использованием коммерческих удобрений были работы в Норвегии в 1976 году (Sendstad, 1980). Ряд работ посвящён изучению влияния различных типов удобрений и различных методов их внесения в почвы,

прибрежные зоны или в болота. Эти работы демонстрируют, что биостимуляция за счёт периодического внесения неорганических удобрений (нитрат аммония и тройной суперфосфат), увеличивала скорость удаления нефтепродуктов с пляжей (Lee and Levy, 1989). Результаты, полученные на побережье, показали, что при высоком уровне загрязнения происходила существенная деградация нефти в участках с внесением удобрений. Результаты в болотистой местности были обратными. Возрастание деградации за счёт удобрений было значительным при низком уровне загрязнения (0,3%), но этого не наблюдалось при 3%-ом содержании нефти, которое связано с проникновением нефти в анаэробную зону, где деградация осуществляется более медленно. В других полевых экспериментах, проводимых Ли с соавт. (Lee et al., 1995), сравнивали действие неорганических питательных веществ с органическими (рыбная костная мука). Полученные данные продемонстрировали, что органическое удобрение имело наибольшее влияние на микробный рост в результате присутствия быстро утилизируемых форм углерода в костной муке, в то время как неорганические удобрения были намного более эффективными в стимуляции биодеградации сырой нефти.

Полевые испытания, проведенные на заболоченной местности, показали, что биостимуляция была неэффективной при обработке нескольких нефтезагрязнённых болот с солёной водой и заболоченной территории с пресной водой в результате ограничения доступа кислорода (Garcia-Blanco et al., 2001; Venosa et al., 2002). В 1999 и 2000 годах были проведены эксперименты на побережье реки Святого Лоуренса. Полученные результаты продемонстрировали, что во всех участках только около 35% алканов и ПАУ подверглось деградации в течение первых 21 недель. Эта работа также свидетельствует о том, что наиболее эффективно процесс биодеградации происходил на поверхности участков, на которых отсутствовали растения.

Все эти результаты подтвердили, что успех биостимуляции зависит от свойств нефти или нефтепродуктов, природы питательных добавок и характеристик загрязнённого сайта. Когда кислород не является лимитирующим фактором, одним из ключевых аспектов успешной биостимуляции является поддержание оптимального уровня питательных веществ. Для этого в полевых условиях, особенно в водной среде, требуется частое применение хорошо растворимых питательных добавок.

Применение медленно растворимых удобрений является одним из подходов, для того чтобы преодолеть проблему вымывания удобрений и обеспечить постоянный источник питательных веществ для микроорганизмов-деструкторов на загрязнённой территории. Медленно растворимые удобрения являются также доступными

продуктами питательных веществ обычно в твёрдой форме. Они состоят из относительно нерастворимых или малорастворимых питательных веществ, покрытых гидрофобными материалами, такими как парафин или растительные масла. Такой подход может быть менее дорогим, чем добавление хорошо растворимых удобрений, поскольку не требует их частого применения. Показано, что малорастворимые удобрения могут быть более перспективными при биоремедиации нефтяных загрязнений почвогрунтов. Например, при аварии танкера «Exxon Valdez», медленно растворимое удобрение в гранулах, Кастомблен (Customblen) (Sierra Chemical Co.), было выбрано как один из агентов биоремедиации для очистки около 120 км береговой линии, загрязнённой нефтепродуктами в течение 1989 и 1990-х годах. Это удобрение состоит из растительного масла, покрытого фосфатом кальция, фосфатом аммония и нитратом аммония (N:P:K соотношение 28:8:0). Результаты показали, что применение Кастомблена стимулировало очистку прибрежной зоны пролива принца Вильяма (Atlas, 1995; Swannell et al., 1996).

Главным требованием для применения мало растворимых удобрений является контроль скорости поступления питательных веществ в окружающую среду. Например, если питательные вещества поступают очень быстро, то они скорее всего быстро будут вымываться из загрязнённого объекта (например, почвы) и в таком случае, удобрения не будут постоянными источниками питательных веществ. С другой стороны, если они попадают в окружающую среду очень медленно, концентрация необходимых питательных веществ не достигнет уровня, достаточного для поддержания высокой скорости биодеградации и в результате биостимуляция будет менее эффективной.

Исследователи европейской программы EUREKA BIOREN проводили полевые испытания в водных экосистемах (устьях рек), чтобы оценить эффективность действия двух продуктов, предназначенных для биоремедиации – BIOREN1 и BIOREN2 (Le Floch et al., 1997 и 1999). Из рыбной муки было получено два таких продукта в гранулированной форме, содержащих мочевину и суперфосфат в качестве источников азота и фосфора, и белковое вещество как источник углерода. Основным различием между этими двумя продуктами было то, что BIOREN1 содержит также биосурфактант. В качестве модельного загрязнителя в этом полевом эксперименте была использована лёгкая арабская сырая нефть. Результаты показали «стартовый эффект» для состава BIOREN1: биодеградация значительно усилилась на протяжении первых пяти недель эксперимента. Однако, после пяти недель, её эффективность уменьшилась. Таким образом, авторы сделали вывод, что BIOREN1 перспективен для

увеличения микробной активности непосредственно после нефтяного разлива. Полученные данные позволяют предположить, что биосурфактант в составе BIOREN1 является наиболее активным компонентом, который способствует увеличению скорости деградации нефти, поскольку BIOREN2, который не содержит биосурфактанта, не был эффективен.

Другим коммерческим продуктом является Oil Spill Eater II (OSE II) (Oil Spill Eater International, Corp.). Он описан как питательно-ферментная добавка и состоит из «азота, фосфора, легко доступного углерода, и витаминов для быстрого роста природных бактерий». Для исследования эффективности OSE II для биодеградации углеводородов в местах, загрязнённых нефтепродуктами, проводили полевые испытания на сайте в Marine Corps Air Ground Combat Center в Калифорнии (Zwick et al., 1997).

Общепринятые обычные удобрения, предназначенные для биоремедиации нефтяных разливов, являются недорогими, легко доступными и эффективными при их правильном использовании. Однако, из-за некоторых недостатков обычных удобрений (например, быстрое вымывания из почвы при высокой её влажности), некоторые олеофильные удобрения были оценены и зарегистрированы на рынке как вещества для биоремедиации. Целесообразным в использовании олеофильных органических добавок является то, что биодеградация нефти в основном происходит в интерфазе масло-вода и впоследствии олеофильные удобрения способны адгезироваться к нефти и доставлять питательные вещества к интерфазе масло-нефть, где локализуются микроорганизмы-деструкторы с гидрофобной клеточной стенкой.

Французскими исследователями (Societe, CECA S.A., Франция) была разработана смесь удобрений в виде эмульсии, состоящей из мочевины (источник азота), лаурилсульфата (источник фосфора), олеиновой кислоты (как гидрофобное вещество) и 2-бутокси-1-этанола (как сурфактант). На основе этой разработки французская фирма «Эльф-Акитен» начала производить препарат Инипол (Inipol EAP 22). Он был использован для очистки побережья Бретани во Франции после аварии танкера «Амоко-Кадиз» и позднее на Аляске, где потерпел аварию танкер «Иксон Вальдез» и в результате на береговые пляжи и скалы попало около 50000 т сырой нефти. Обработку проводили в конце мая – начале июня 1989 г. и повторно летом 1990 г. Сообщалось, что добавка удобрения ускорила деструкцию нефтяных углеводородов микроорганизмами в 3-5 раз.

Инипол в настоящее время является самой распространённой зарубежной биостимулирующей питательной добавкой, применяемой в технологиях

биоремедиации нефтезагрязнённых территорий, в том числе, в условиях холодного климата. При проведении биоремедиации антарктических морских отложений Делилль с соавт. (Delille et al., 2002) показали, что добавление в грунт рыбного компоста более значительно влияло на скорость биодеградации нефти, чем добавление Инипола. Позднее группой этих исследователей (Delille et al., 2004; Delille et al., 2007) были проведены полевые испытания на двух различных типах почв в месте The Grande Terre (архипелаг Кергелен) с целью изучения длительного влияния питательных добавок на скорость биодеградации, изменение численности микробных популяций и токсичность нефтепродуктов в экстремальных субантарктических условиях. В сайтах с добавлением Инипола наблюдалось большая степень деградации алканов, чем в контрольных сайтах без Инипола. Интересно отметить, что Инипол не оказывал влияния на скорость биодеградации ПАУ. В вышеописанных экспериментах степень деградации общих углеводородов составила 95% за 1 год.

Изучение биодеградации нефти, попавшей в окружающую среду после аварий нефтяных танкеров, например, «Bahia Paraiso» в Антарктике и «Exxon Valdez» у берегов Аляски в течение 1989 года, продемонстрировало, что эффективность биодеградации нефти в условиях холодного климата была лимитирована доступностью питательных веществ, таких как азот и фосфор, что было подтверждено результатами других исследователей, полученными в лабораторных и полевых экспериментах (Margesin and Shinner, 1999).

Возможность осуществления биостимуляции как одного из вариантов очистки постоянно загрязнённой дизельным топливом альпийской ледяной территории в Тироле была исследована в работах тех же авторов (Margesin and Schinner, 2001; Margesin et al., 2007). Показан положительный эффект от внесения в загрязнённые сайты удобрения Инипол. Однако, следует иметь в виду, что внесение биогенных добавок может оказывать и негативное влияние на численность психрофильных и психротрофных микроорганизмов-деструкторов углеводородов, что было продемонстрировано в работе (Margesin and Schinner, 1999).

В последнее время для ускорения биодеградации нефти и снижения токсичности в полевых испытаниях стали использовать хитин как недорогое новое средство (Richmond et al., 2001).

Вышеописанные питательные добавки и удобрения различных видов (плохо и хорошо растворимые, олеофильные) являются основным «инструментом» при применении такого подхода биоремедиации как активация аборигенных микроорганизмов.

Следует отметить, что эффективность вышеописанных разных типов питательных добавок зависит от характеристик загрязнённых экосистем и состава самих добавок. Малорастворимые удобрения, возможно, могут быть идеальным источником питательных веществ, если скорости их попадания в окружающую среду хорошо контролируются и регулируются. Хорошо растворимые удобрения, вероятно, более рентабельны на песчаных побережьях, когда доступ воды ограничен. Олеофильные удобрения являются более подходящими для использования на каменистых побережьях. Успешное применение коммерческих продуктов, предназначенных для биоремедиации, будет всегда требовать соответствующих экспериментальных моделей, испытаний и анализов, основанных на специфичных условиях каждой загрязнённой экосистемы.

Таким образом, активация аборигенных микроорганизмов является необходимым и эффективным условием успешной биоремедиации нефтезагрязнённых территорий, особенно в регионах с холодным климатом.

6.2 Интродукция микроорганизмов-деструкторов (биоаугментация)

Начиная с 70-х годов прошлого века, интродукция микроорганизмов-деструкторов для увеличения численности нефтеокисляющей микробной популяции была предложена как альтернативная стратегия биоремедиации окружающей среды, загрязнённой нефтью и нефтепродуктами. Этот подход применяется в тех случаях, когда популяции аборигенных микроорганизмов не способны деградировать широкий спектр потенциальных субстратов, находящихся в нефти (Leahy and Colwell, 1990) или же аборигенные микроорганизмы находятся в стрессовом состоянии, являющемся результатом токсического воздействия нефтяных разливов. Другими условиями, при которых возможно применение биоаугментации, является малая численность аборигенных нефтеокисляющих микроорганизмов, низкая скорость самоочищения (основной показатель), а также когда внесение микроорганизмов-нефтедеструкторов приведёт к уменьшению лаг-периода начала процесса биоремедиации (Forsyth et al., 1995). Чтобы применение этого метода биоремедиации имело успех в полевых условиях, интродуцированные микроорганизмы должны соответствовать ряду требований, а именно: быть способны деградировать наибольшее количество компонентов нефти, сохранять генетическую стабильность и жизнеспособность в окружающей среде, эффективно конкурировать с аборигенными микроорганизмами и проникать в поры почвы или других отложений непосредственно к загрязнителю (Goldstein et al., 1985).

Известно, что микроорганизмы, выделенные из загрязненных сайтов (Olsen, 1985; Binder et al., 1993), обладали значительными деградативными свойствами и были успешно использованы для биоремедиации в пилотных исследованиях. Так, скорость биодеградации нафталина штаммом *P. putida* достигала 61 мг $л^{-1}час^{-1}$ (Yu et al., 2006). Штаммы *P. aeruginosa* WatG и *Serratia* marcescens HohM, выделенные в Японии (Wongsa et al., 2004), были способны деградировать 90-95% дизельного топлива и керосина за 2 и 3 недели, соответственно, и 72% нефти в течение 4 недель. Изолят *Flavobacterium* sp. DS-711, выделенный из морских седиментов, деградировал 90% н-алканов керосина (Moriya and Horikoshi, 1993). Штамм *Bacillus subtilis* эффективно разлагал 98% н-гексадекана и 75% нафталина (Christova et al., 2003).

Существуют ситуации, когда внесение нефтеокисляющих микроорганизмов в загрязнённую окружающую среду не только оправданно, но и совершенно необходимо. Например, в случаях аварийных разлив нефти в открытом море, где нефтеокисляющие бактерии практически отсутствуют.

Анализ литературных данных показывает, что наиболее распространёнными в загрязнённых нефтью сайтах являются представители родов *Rhodococcus*, *Pseudomonas, Arthrobacter, Microbacterium*. В хронически загрязнённых почвах доминирующей группой часто являются родококки. Кроме того, деградировать углеводороды нефти способны бактерии родов *Moraxella, Beijerinckia, Aeromonas, Flavobacterium, Nocardia, Corynebacterium, Acinetobacter, Streptomyces, Bacillus*, Cyanobacterium и других (Thapa et al., 2012). Целесообразно сравнение физиологических и экологических характеристик наиболее распространённых микроорганизмов-деструкторов для теоретического обоснования интродукции бактерий определённых родов. Сравнивая способы поглощения углеводородов различными бактериями, можно отметить, что в этом процессе родококки имеют преимущество, так как поглощают субстрат всей поверхностью клетки. Гидрофобность и многослойность структуры клеточной стенки позволяет этим бактериям минерализовать значительное количество углеводородов (Коронелли, 1996). В результате в клетках образуется пул резервных углеводородов и липидов, что обеспечивает высокую выживаемость родококков в условиях голодания по сравнению с псевдомонадами (Коронелли и др., 1982а). С другой стороны, быстрая адаптация к новому субстрату, высокая скорость роста на водорастворимых органических соединениях облегчают выживание псевдомонад в естественной среде (Коронелли, 1996).

Методы, применяемые при интродукции отобранных микроорганизмов-деструкторов в места разливов, патентуются, начиная с 1970 года. Однако, до аварии «Exxon Valdez» в 1989 году было доступно немного информации об использовании коммерческих продуктов для биоаугментации. Атлас и Барта (Atlas and Bartha, 1973) провели один из первых экспериментов по определению эффективности коммерческой смеси бактериальных культур. Два коммерческих препарата, представляющие собой инокулят штаммов-деструкторов углеводородов нефти, Ekolo-Gest (также продаваемый под маркой Petrobac, National Chem. Corp.) и DBC bacteria (Gerald Bauer Corp.), были протестированы в лабораторных условиях для сравнения эффективности деградации ими сырой нефти. Однако, ни один из коммерческих препаратов не был эффективнее аборигенных микроорганизмов, выделенных из морской воды.

Одними из первых полевые испытания по биоремедиации водной среды, загрязнённой нефтепродуктами, с использованием микробной ассоциации, описали Ли и Леви (Lee and Levy, 1989). В этой работе проводили внесение смеси штаммов-деструкторов нефтепродуктов (*Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas stutzeri* и *Bacillus subtilis*) на песчаный загрязнённый пляж. Результаты показали, что количество нефтепродуктов в обработанных ячейках уменьшилось незначительно. Подобные результаты были получены группой исследователей из Техасского университета, которые оценивали эффективность двух коммерческих биопрепаратов для удаления нефтяных разливов на территории Техаса на прибрежной заболоченной территории (Simon et al., 1999). Были применены четыре варианта очистки: контроль с нефтью, биостимуляция с добавлением неорганических питательных веществ (диаммоний фосфат), биоаугментация с каждым из коммерческих продуктов. Полученные данные продемонстрировали, что добавление микробных препаратов незначительно увеличило скорости биодеградации углеводородов нефти. Авторы также отметили, что один из препаратов (BP8) «показал сравнительно высокие скорости биодеградации, хотя эти показатели незначительно отличались от контроля». Данный микробный продукт применялся с поставляемыми с ним неорганическими питательными веществами, поэтому трудно было установить – что именно: микробный или питательный компонент увеличивал скорость биодеградации. То обстоятельство, что ни добавление препаратов для биоаугментации, ни применение неорганических веществ значительно не увеличило биодеградацию углеводородов нефти, подтвердило, что и другие факторы, например, такие как доступность

кислорода, могут ограничивать деградацию нефти в данных условиях окружающей среды.

Несколько возможных причин неспособности интродуцированных микроорганизмов деградировать загрязнители в открытой окружающей среде были проанализированы и суммированы Голдстейном с соавт., 1985 (Goldstein et al., 1985): (1) концентрация поллютанта может быть низкой и недостаточной, чтобы обеспечивать рост микроорганизмов, входящих в состав инокулята, (2) природная среда может содержать вещества, ингибирующие рост или активность интродуцированных микроорганизмов, (3) скорость роста бактериальных видов может быть лимитирована простейшими одноклеточными организмами, (4) в природе внесённые микроорганизмы сначала могут использовать другие субстраты, им более доступные, чем загрязнители, (5) штаммы-деструкторы, возможно, неспособны проникать через поры почвы или других отложений к загрязнителям.

Несмотря на это, некоторые полевые эксперименты продемонстрировали эффективность подхода биоаугментации, например, использование препарата Alpha BioSea для обработки разлива сырой нефти из танкера «Mega Borg» на побережье Texaca (Swannell et al., 1996) и применение препарата TerraZyme для повышения эффективности деградации тяжёлых нефтепродуктов при аварии танкера «Находка» в Японии (Tsutsumi et al., 2000). Однако, в описанных случаях, успех биоаугментации был подтверждён лишь визуальными наблюдениями и анализом цифровых фотографий.

В условиях, когда отсутствие ростового субстрата сочетается с низкой температурой среды обитания, например, в водных экосистемах Арктики и Субарктики, наибольшей выживаемостью обладали такие бактерии, как *Arthrobacter* ceroformans и *Rhodococcus erythropolis*: их численность была на уровне исходной и выше, тогда как численность ацинетобактерий и псевдомонад сокращалась на 80% (Коронелли и др., 1988).

Таким образом, в регионах с холодным и умеренным климатом интродукция углеводородокисляющих бактерий необходима, и в качестве интродуцентов рекомендуются именно родококки (например, *R. erythropolis*). Углеводороды как субстрат не обладают аттрактантными свойствами для подвижных бактерий, т.к. не содержат функциональных групп, возбуждающих их двигательные рецепторы. Метаболизм родококков приводит к появлению окисленных соединений, которые привлекают псевдомонад. Таким образом, интродукция родококков способствует усилению биодеградации не только непосредственно, но и косвенно, через

формирование комплексного углеводородокисляющего сообщества (Коронелли и др., 1982б).

Загрязнения нефтью и нефтепродуктами является распространённым явлением в Арктике. В ряде работ показано присутствие психрофильных и психротрофных аборигенных микроорганизмов, способных деградировать углеводороды нефти при низких температурах в арктических и субарктических почвах (Whyte et al., 1999, 2001; Soloway et al., 2001). Исследования в лабораторных и полевых условиях с использованием накопительных культур из загрязнённых сайтов показали, что биоаугментация ускоряет процесс биодеградации в арктической почве даже без применения удобрений (Whyte et al., 1999; Thomassin-Lacroix et al., 2002). Однако, стимулирующее влияние биоаугментации в полевых биореакторах было меньше, чем действие удобрений (Mohn et al., 2001). Подобные результаты были получены Сталлвудом с соавт. (Stallwood et al., 2005) при использовании биостимуляции и биоаугментации для очистки почвы из Антарктики от нефтепродуктов при 4°C. Наиболее эффективно процесс биоремедиации происходил при совместном применении биостимуляции и биоаугментации (степень деградации достигала примерно 100% после 18 недель инкубации).

Возможность *on-site* биоремедиации как одной из технологий биологической очистки была продемонстрирована в полевых экспериментах в арктической пустыне (Canadian Forces Alert, Nunavut), загрязнённой дизельным топливом, с применением биореакторов (0,25-0,5 м3). В биореакторы были внесены фосфор, мочевина, сурфактанты и лиофилизированный инокулят. Уровень загрязнения (2,9 г/кг почвы) был снижен на 83% после 65 дней при средней дневной температуре 10-14°C (Thomassin-Lacroix et al., 2002). Обработка почвы из двух военных радиолокационных объектов в канадской арктической тундре включала внесение источников азота и фосфора, торфа для увеличения объёма почвы, инокуляцию лиофилизированной накопительной культуры углеводородокисляющих микроорганизмов и укрытие биореакторов пластиковым полотном, которое увеличивало температуру (Mohn et al., 2001). После первого года, углеводороды полностью, или почти полностью (на 92%) были утилизированы в биореакторах с добавлением вышеперечисленных компонентов, тогда как в контрольных биореакторах без углеводородокисляющих микроорганизмов концентрация углеводородов уменьшилась лишь на 64-66%.

Одна из технологий, в настоящее время применяемая довольно редко, основана на обогащении образцов загрязнённой почвы или воды в лабораторных или промышленных условиях в биореакторах аборигенными углеводороокисляющими

микроорганизмами и последующей реинтродукции их в загрязнённую окружающую среду (Carberry et al., 2001). После предварительной обработки образцы, являющиеся, по сути, биопрепаратом – источником активной нефтеокисляющей популяции, вносили в загрязнённый участок вместе с необходимыми биогенными добавками, повышающими эффективность утилизации загрязнителя. Этот приём основан на том, что почти в любой почве существуют микроорганизмы, способные метаболизировать компоненты нефти. Однако их развитию в естественной среде могут препятствовать неблагоприятные факторы: низкая температура, недостаток кислорода и биогенных элементов, избыточная кислотность и т.д. Реализовать принцип создания оптимальных условий для развития природных нефтеокисляющих микроорганизмов проще в лабораторных или промышленных биореакторах. Преимуществом реинтродукции аборигенных микроорганизмов является также то, что вносимая в почву микробная ассоциация не будет чужеродной для данного биоценоза. В работе Плешаковой с соавт. (Плешакова с соавт., 2005) показано, что для ускорения очистки почвы от нефтепродуктов может быть использован приготовленный в лабораторных условиях биопрепарат, представляющий собой обогащённую культуру аборигенных микроорганизмов-деструкторов, выделенных из очищаемого участка. Эффективность использования этого препарата подтверждена в экспериментах по очистке загрязнённой почвы и воды. Степень очистки повысилась по сравнению с контролем в 4-8 раз в почве и в 18-24 раза в воде в зависимости от концентрации в них нефти.

Метод реинтродукции природных ассоциаций углеводородокисляющих бактерий, выделенных из Балтийского моря и использованных в качестве накопительной культуры как основы биопрепарата «Морской снег», был реализован в технологии его применения (Сребняк и др., 2006; 2008).

Таким образом, интродукция микроорганизмов в загрязнённые объекты необходима для биоремедиации нефтезагрязнённых почв или при попадании нефтепродуктов в водные среды, где развитие природной популяции микроорганизмов происходит медленно, даже при благоприятных условиях окружающей среды. Для очистки почв и водных поверхностей при низких температурах процесс биоремедиации даёт хорошие результаты при интродукции препаратов, в состав которых входят микроорганизмы, выделенные непосредственно из мест загрязнения. Важным фактором при этом является вспашка и рыхление верхних слоёв почвы, за счёт чего обеспечивается необходимый уровень снабжения кислородом. Хороший эффект наблюдается при одновременном внесении в

загрязнённые сайты биопрепаратов с минеральными удобрениями, содержащими источники азота, фосфора и калия.

Повышению эффективности метаболизма и нефтеокисляющей активности микроорганизмов может способствовать их иммобилизация на сорбентах, так как иммобилизованные клетки более устойчивы к неблагоприятному воздействию факторов окружающей среды (Чугунов и др., 2000б). Для иммобилизации микроорганизмов используют различные вещества, например, полиуретан, полиэфиры, активированный уголь, кремнезем, альгинат и другие носители (Коронелли, 1996).

Разработанный Чугуновым с соавт. (Чугунов и др., 2000б) биопрепарат «Экосорб» на основе *Mycobacterium fluorescens, Mycobacterium* sp., *Rhodococcus* sp. и *Acinetobacter* sp., иммобилизованных на лессорбе – продукте термической обработки мха и древесины, при внесении в почву с нефтью повышал степень очистки от загрязнителя на 40% за 1 месяц по сравнению с контролем.

Аналогичные результаты были получены группой исследователей под руководством Э.В. Карасёвой, которые показали, что адсорбционная иммобилизация клеток родококков на носитель-сорбент обеспечивает более высокую скорость и величину снижения концентрации углеводородов по сравнению со свободными клетками при очистке нефтезагрязненных песка, песчаного грунта и воды (Карасёва и др., 2006а; Карасёва и др., 2006б; Карасёва и др., 2008).

При иммобилизации микробных клеток повышается их деструктивная активность вследствие увеличения биодоступности гидрофобного субстрата, адсорбированного на поверхности носителя (Коваленко и др., 2006). В этой работе также было показано, что клетки *Rhodococcus ruber*, иммобилизованные на слое каталитического волокнистого углерода пенокерамики, деградируют в 3,7 раза больше гексадекана, чем в свободном суспендированном состоянии.

Принято считать, что среди общеизвестных физико-химических способов очистки от загрязнений нефтью и нефтепродуктами в результате аварийных разливов при их добыче, транспортировке и переработке, на нефтяных железнодорожных и морских терминалах, нефтебазах и других объектах наиболее эффективным является метод сорбции, сочетающий высокую степень очистки и эксплуатационную надёжность с относительной простотой использования и низкой стоимостью.

Алексеевой с соавт. (Алексеева и др., 2000) было предложено использование торфа для очистки нефтезагрязненных почв. Торф, вследствие развитой поверхности и наличия углеводородокисляющих микроорганизмов в почве, которые адсорбируются

на нём, может служить как сорбентом нефтяных компонентов, так и их деструктором. Численность бактерий-деструкторов в торфе по данным Алексеевой в 4-5 раз превышает аналогичный показатель для почв. В эксперименте смешивание торфа с нефтезагрязненной почвой обеспечивало деградацию 72% нефти за 1 месяц.

Было показано (Suni et al., 2004), что растительный сорбент на основе пушицы (Eriophorum vaginatum) способен адсорбировать различные виды нефтепродуктов (бензин, дизельное топливо, синтетическое масло, минеральное масло, тяжёлые фракции нефти) быстрее и эффективнее, чем синтетические сорбенты (Teas et al, 2001). Пушица растёт на торфяных болотах. В связи с этим она является побочным продуктом при добыче торфа. Растительный сорбент на основе пушицы идеально подходит для адсорбции нефтепродуктов с водной поверхности, потому что почти не поглощает воду. Низкий удельный вес сорбента обеспечивает быстрое и простое его удаление с водной поверхности после окончания процесса адсорбции нефти и нефтепродуктов, к тому же он является биодеградабельным.

При разработке технологий биоремедиации загрязнённых углеводородами нефти разных объектов как с помощью интродуцированных микроорганизмов, так и с участием природных микроорганизмов, должны быть подобраны условия, обеспечивающие максимальную активность микробных популяций. Поэтому наиболее эффективно применение комплексных технологий биоремедиации. При этом необходимо учитывать климатические условия регионов, где произошло загрязнение, поскольку способ удаления поллютанта и выбор интродуцируемых штаммов-деструкторов будет напрямую зависеть от типа экосистемы, конкретного загрязнителя, масштабов и сроков загрязнения, температуры окружающей среды, влажности, pH среды и других факторов.

Глава 7. Биопрепараты для очистки от нефтяных загрязнений: принципы разработки и применения

7.1 Разработка биопрепаратов

К настоящему времени в России разработано и применяется несколько десятков биопрепаратов для очистки окружающей среды от загрязнений нефтью и нефтепродуктами (Рогозина и др., 2010; Киреева и др., 2010; Кузнецов и др., 2010), однако далеко не все они нашли свое применение, многие из них даже не запатентованы, а по некоторым можно найти только рекламную информацию.

Основой биопрепаратов для очистки от нефтяных загрязнений являются один или несколько штаммов микроорганизмов-деструкторов, эффективно разлагающих углеводороды нефти. Кроме них в состав биопрепаратов могут входить сорбенты, носители, стабилизаторы, консерванты, ферменты, поверхностно-активные вещества, различные органические и минеральные вещества, назначение которых может быть достаточно разнообразным.

В последнее время всё чаще используют биопрепараты, состоящие из двух и более штаммов, поскольку интродукция монокультуры углеводородокисляющих микроорганизмов в нефтезагрязнённую среду не может полностью решить проблему очистки. Как уже отмечалось, нефть является сложным субстратом, состоящим из нескольких сотен соединений, и отдельный штамм не способен к её полной утилизации, поскольку не обладает всем спектром ферментов, необходимых для этого. С этой точки зрения стимуляция аборигенных микроорганизмов находится в более выигрышном положении, так как при этом активируется большое количество различных таксономических групп микробиоценоза. Поэтому перспективным подходом может быть использование нескольких штаммов, существенно отличающихся по спектру потребляемых субстратов и особенностям метаболизма. Например, показано (Sathishkumar et al., 2008), что бактериальный консорциум из 4 штаммов деградировал 77% нефти при ее концентрации 1% в жидкой минерально-солевой среде, тогда как по отдельности, каждый штамм был способен разлагать: 69% нефти – *Pseudomonas* sp. BPS 1-8; 64% - *Bacillus* sp. ISS 1-7; 45% - *Pseudomonas* sp. HPS 2-5; 41% - *Corynebacterium* sp. BPS 2-6. Однако, увеличение концентрации нефти в среде с 1 до 12% снижало эффективность её деградации этим консорциумом до 45%.

С другой стороны, необходимо отметить, что создание универсального биопрепарата невозможно потому что: во-первых, как уже неоднократно отмечалось, нефть состоит из нескольких сот соединений, причём нефти разных месторождений отличаются друг от друга по фракционному и композиционному составу; во-вторых, в практике биоремедиации приходится сталкиваться не только с нефтяными загрязнениями, но и с загрязнениями нефтепродуктами, которые резко отличаются по химическим свойствам от сырой нефти; в-третьих, районы добычи, переработки и хранения нефти и нефтепродуктов значительно отличаются друг от друга по природно-климатическим и гидротермическим условиям.

В связи с этим, для каждого типа нефти, каждого региона и каждого места загрязнения возникает необходимость создания специализированного биопрепарата, что просто невозможно технически. Одним из вариантов решения данной проблемы

является выделение из конкретного нефтезагрязнённого объекта активных углеводородокисляющих микроорганизмов, составление из них препарата и интродукция этого биопрепарата в исходную, очищаемую среду, что и предлагают некоторые авторы (Кобзев, 2003; Сребняк и др., 2006- патент РФ №2327649; Сребняк и др., 2008).

Подобный подход требует наличия быстрого и эффективного метода скрининга штаммов-нефтедеструкторов, а также необходимости изучения выделенных штаммов для последующего составления ассоциации микроорганизмов-нефтедеструкторов.

Углеводородокисляющие микроорганизмы обычно выделяют из образцов грунта или воды, загрязнённых нефтью или нефтепродуктами с использованием метода накопительных культур (Wongsa et al., 2004). После выделения штаммов проводится анализ их деградативной активности в отношении различных субстратов, прежде всего на нефти и нефтепродуктах. При этом определяется как численность микроорганизмов при росте на нефти, так и скорость утилизации нефти, изменение её фракционного состава в процессе потребления исследуемым штаммом. С использованием гравиметрического метода определяются следующие фракции нефти: гексановая, бензольная и спирто-бензольная. Для изучения субстратной специфичности микроорганизмов проверяется их способность к росту на различных углеводородах, входящих в состав нефти – алифатических, гетероциклических, моно- и полициклических ароматических углеводородах. Проверяется способность микроорганизмов к росту при различных температурах, значениях pH среды и в присутствии солей, а также способность продуцировать биосурфактанты. Наиболее активные штаммы идентифицируются (Пырченкова и др., 2006).

В настоящее время не существует разработанного подхода к составлению ассоциаций микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти как основы биопрепаратов для ликвидации нефтяных загрязнений. Составление ассоциаций, как правило, происходит путём случайного комбинирования активных углеводородокисляющих микроорганизмов. При этом, чаще всего, учитываются только такие критерии как углеводородокисляющая активность культур, рост в широком диапазоне температур и pH, отсутствие антагонизма по отношению к другим членам ассоциации и некоторые другие. Исследования показали (Кобзев, 2003), что не всегда деградативная активность ассоциации равна сумме активностей отдельных штаммов, кроме того, в ряде случаев активность ассоциации может быть даже ниже, чем у составляющих её монокультур. Отсутствие эффекта «суммирования» активностей может объясняться тем, что микроорганизмы-нефтедеструкторы,

входящие в состав ассоциации, обладают сходными углеводородокисляющими ферментными системами, и поэтому утилизируют близкие по структуре соединения. Это приводит к возникновению конкуренции между штаммами ассоциации за субстрат. Результатом подобной конкуренции является интенсивное потребление легкодоступных углеводородов на первых этапах деструкции, снижение численности микроорганизмов, накопление продуктов промежуточного окисления углеводородов, и, как следствие, снижение степени деструкции нефти. Для составления эффективной ассоциации штаммов-деструкторов необходимо, чтобы углеводородокисляющие ферментные системы входящих в состав ассоциации штаммов дополняли друг друга. Одним из подходов, основанных на данном принципе, является включение в состав ассоциаций штаммов, относящихся к разным таксономическим группам. Данный подход, являющийся наиболее распространённым и простым, основан на том, что штаммы, относящиеся к разным таксонам, могут обладать разными углеводородокисляющими ферментными системами. В состав ассоциаций часто включают штаммы родов *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus* и *Mycobacterium* в разных соотношениях.

Другим подходом к составлению микробных ассоциаций может являться кластерный анализ с построением дендрограмм на основании изученных свойств штаммов. Штаммы, имеющие сходные характеристики роста и деградации загрязнителя, располагаются на дендрограмме близко друг к другу. Чем дальше располагаются штаммы, тем больше между ними различий. Для создания высокоактивных ассоциаций необходимо учитывать взаимоотношения между микроорганизмами. При этом необязательно, чтобы ассоциация состояла только из активных нефтедеструкторов. Возможно, наиболее активной будет ассоциация, состоящая из нескольких активных нефтедеструкторов (ориентированных на разные фракции) и нескольких гетеротрофных микроорганизмов, не обладающих углеводородокисляющей способностью, но способных ассимилировать продукты промежуточного окисления углеводородов, часто токсичных для углеводородокисляющих микроорганизмов.

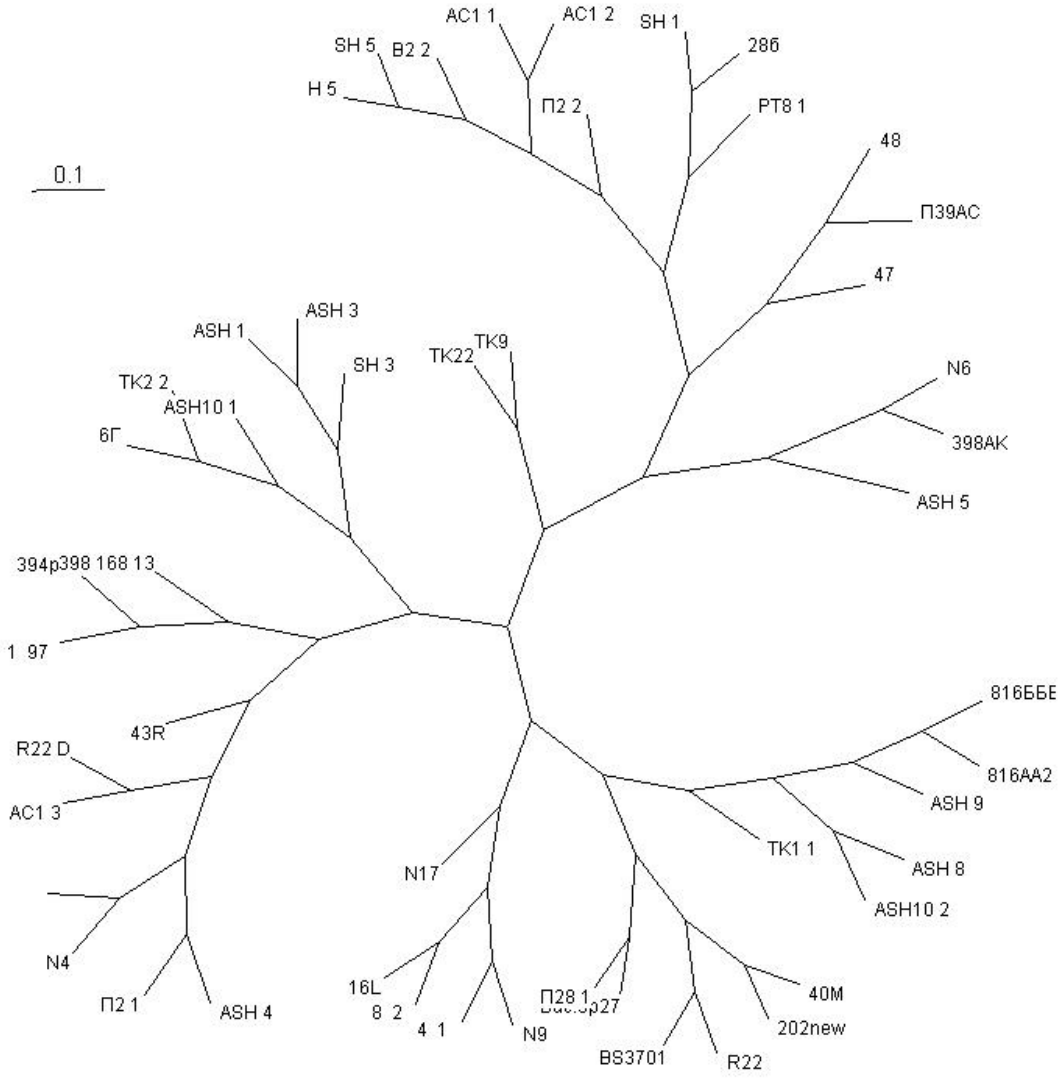


Рис. 7. Дендрограмма штаммов-нефтедеструкторов, построенная на основании кластерного анализа их культурально-морфологических, биохимических и метаболических свойств.

Кроме того, микробные ассоциации могут быть отобраны в процессе селекции в модельных системах. Например, такой модельной системой может быть периодическое культивирование в качалочных колбах или многостадийное непрерывное культивирование в проточной открытой системе, состоящей из нескольких последовательно соединённых биореакторов (Кобзев, 2003; Ахметов и др., 2006; Шкидченко и др., 2007).

7.2 Применение биопрепаратов

В настоящее время активно используют следующие препараты: «Путидойл» (Pseudomonas putida), «Олеворин» (*Acinetobacter oleovorans*), «Экойл» (*Pseudomonas fluorescens*) (Градова и др., 2003), «Дестройл» (*Acinetobacter* sp.), «Бациспецин»

(*Bacillus* sp.) (Логинов и др., 2004), «Деворойл» (дрожжи рода *Candida* и бактерии *Rhodococcus* sp., *Rhodococcus morus*, *Rhodococcus erythropolis*, *Alcaligenes* sp. и *Pseudomonas stutzeri*) (Градова и др., 2003), «Универсал», «Ленойл» (*Bacillus brevis* и *Arthrobacter* sp.) (Логинов с соавт., 2004) и «Родер» (*Rhodococcus erythropolis*) (Murygina et al., 2000), «Фитоспорин» (*Bacillus subtilis*), «Метаболит Н1» (экстракт биологически активных веществ гриба *Scopulariopsis acremonium*), «Белвитамил» (активный ил очистных сооружений целлюлозно-бумажного производства, содержит углеводородокисляющие микроорганизмы родов *Arthrobacter, Bacillus, Candida, Desulfimbrio, Pseudomonas*) (Киреева и др., 2010).

Применение препарата «Деворойл» описано во многих работах. Например, для биоремедиации загрязненного нефтью чернозема Габбасовой с соавт. (Габбасова и др., 2002) был применен «Деворойл» в комплексе с биологической добавкой «Биотрин» (белковая добавка и минералы), в процессе очистки за 110 дней в почве было утилизировано 96% загрязнителя.

Градова с соавторами (Градова и др., 2003) выявили стимулирующее действие *Azotobacter chroococcum* на процессы биоремедиации нефтезагрязненных почв углеводородокисляющими микроорганизмами, входящими в состав препарата «Деворойл»: за 6 недель в присутствии только биопрепарата степень биодеструкции нефти достигла 69%, а при добавлении *Azotobacter chroococcum* – 79%. При этом всхожесть семян пшеницы на очищенной территории составляла 58% и 80%, соответственно.

В работе Логинова с соавт. (Логинов с соавт., 2004) была проведена сравнительная оценка эффективности биопрепарата «Ленойл» и других коммерческих препаратов для очистки нефтезагрязнённых почв. Исследования, проведённые в модельных условиях, показали, что биопрепараты, содержащие ассоциации микроорганизмов («Деворойл», «Ленойл»), способны адаптироваться к высоким концентрациям нефти и эффективно утилизировать субстрат независимо от типа почв и особенностей поллютанта. Тогда как биопрепараты-монокультуры («Бациспецин», «Дестройл»), могут быть использованы при концентрациях загрязнителя не более 10%.

Препарат «Универсал» (Маркарова, 2004) разработан на основе нефтеокисляющих бактерий, выделенных из загрязнённых нефтью почв нескольких районов Республики Коми и месторождений Тюменской области. Первые промышленные испытания биопрепарата были проведены в зоне аварии в 1994 г. в Усинском районе Республики Коми. В результате локализации разлива нефти на

площади около 4 га образовались две затопленных водой площадки. Начальный уровень загрязнения грунта составлял от 450 до 750 г/кг. За два года разложение углеводородов в почве и воде за счёт применения биопрепарата и минеральных удобрений составило 35-40%. В 2003-2004 гг. промышленные испытания биопрепарата были проведены также в Тюменской области. Оценка эффективности очистки различных объектов позволила заключить, что биопрепарат «Универсал» эффективен для разложения нефтей с различной вязкостью, плотностью, составом, и может быть рекомендован для выполнения работ по биоремедиации почв и вод в условиях Крайнего Севера России.

В работе Мурыгиной с соавт. (Murygina et al., 2000) описывается применение биопрепарата «Родер» (одного или в комбинации с первоначальным механическим удалением нефти) для ремедиации загрязнённых нефтью водных систем и почв в Московской области и Западной Сибири на протяжении 1994-1999 гг. Было продемонстрировано, что «Родер» эффективен для биоремедиации открытых водных поверхностей (100 $м^2$ бухты реки Чёрная при 15-25°С и двух озёр по 5000 $м^2$ в Вынгаяха при 15-34°С). Степень очистки составляла более 99% при исходном уровне загрязнения 0,4-19,1 г/л. В течении ремедиации заболоченной территории (2000 м2) на Урале при температуре 5-30°С (уровень загрязнения 10,5 г/л) после механического удаления нефти эффективность очистки была 75%, после внесения биопрепарата (дважды) степень очистки достигла 94%. Эффективность биоремедиации 10000 м2 болот в Вынгаяхе (65%) и 1000 $м^2$ торфяной болотистой почвы в Нижневартовске при 0-27°С составила 19%. Это может быть объяснено высоким исходным уровнем загрязнения (24,3 г/л и >750 г/г сухого вещества, соответственно) и невозможностью применения предварительной механической очистки на этих сайтах.

Группой этих же исследователей (Murygina et al., 2005) также проводились полевые работы в республике Коми на обширной заболоченной территории в течение 2002-2003 гг. с применением биопрепарата «Родер», при этом сравнивали эффективность биоремедиации с использованием других препаратов. После применения «Родера» на этом сайте площадью примерно 2000 $м^2$ на протяжении холодного и дождливого лета в 2002 г. (1,5 месяца) уровень нефтезагрязнения снизился на 20-51% от исходного (458-738 г/кг сухой почвы). В середине сентября 2002 г., эта территория была покрыта растительностью на 70-85%. А через год степень очистки уже составляла 54-79%. Было показано, что применение таких биопрепаратов, как «Родер», «Универсал», «Петролан» и «Унирем» более эффективно, чем использование препарата «Бамил», применяемого как биогенная

добавка для сельскохозяйственных почв или для культивации с добавлением удобрений, поскольку в его состав не входят микроорганизмы-деструкторы.

Таким образом, эффективная очистка почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, может быть достигнута внесением биопрепаратов, обладающих высокой активностью в широком диапазоне температур и pH, в сочетании с минеральными или органическими удобрениями, хорошей аэрацией, снижением кислотности, использованием поверхностно-активных веществ.

В данной главе рассмотрены примеры биодеградации нефти и нефтепродуктов микроорганизмами в различных условиях окружающей среды, основные подходы к биоремедиации нефтезагрязнённых территорий (биостимуляция и биоаугментация in situ). Однако, до настоящего времени не существует и, наверное, не может существовать универсальной биотехнологии очистки и восстановления окружающей среды от нефтяных загрязнений. Это связано в первую очередь с тем, что районы месторождений, переработки и хранения нефти и нефтепродуктов значительно отличаются друг от друга по природно-климатическим характеристикам, а транспортировка нефтепродуктов осуществляется по всей территории России. Поэтому, очевидна необходимость выделения микроорганизмов-деструкторов из различных регионов, изучение их метаболических свойств и на их основе разработки биопрепарата для конкретного случая или места загрязнения, который мог бы быть использован в комплексной технологии очистки. Комплексная технология биоремедиации может включать совместное применение методов активации аборигенных микроорганизмов и интродукции биопрепаратов с учетом природно-климатических особенностей.

7.3 Коммерческие препараты на основе углеводородокисляющих микроорганизмов для очистки почвенных и водных экосистем от нефти и нефтепродуктов.

Использование биопрепаратов, созданных на основе ассоциаций штаммов-нефтедеструкторов, способных окислять широкий спектр углеводородов нефти - от длинноцепочечных алканов до полиароматических соединений, позволяет ускорить рекультивирование нефтезагрязненных территорий. Биопрепараты могут быть предназначены для очистки почвогрунтов, водоёмов, технических ёмкостей и поверхностей от нефти и нефтепродуктов, для восстановления функций самоочищения почвы и водоёмов, очистки сточных вод промышленных предприятий, очистки стоков автомоек, автозаправочных станций, территорий предприятий

нефтедобывающей и нефтеперерабатывающей промышленности, депарафинизации скважин, технических резервуаров.

В результате патентного поиска в российской базе данных Федерального института промышленной собственности была суммирована информация о запатентованных в России биопрепаратах для очистки природных экосистем от нефти и нефтепродуктов, которые условно можно подразделить на 3 группы (табл. 5).

Биопрепараты первой группы содержат выделенный из природного или промышленного источника один штамм какого-либо вида микроорганизмов, который способен к эффективной деградации (утилизации) нефти или её производных в процессе жизнедеятельности. Большинство патентов этой группы основано на доказательствах эффективности данного микроорганизма-деструктора, полученных в результате экспериментов в лабораторных условиях.

Ко второй группе относятся биопрепараты, представляющие собой смешанные культуры (ассоциации) различных штаммов-нефтедеструкторов. В последнее время все чаще используют биопрепараты, состоящие из 2 и более штаммов, поскольку интродукция монокультуры углеводородокисляющих микроорганизмов в нефтезагрязненную среду не достаточно эффективна (Барышникова и др., 2001). Нефть - сложный многокомпонентный субстрат, содержащий несколько сотен различных химический соединений, и совершенно очевидно, что один штамм не обладает всем спектром ферментов, необходимых для биодеградации разнообразных углеводородов нефти. Использование же нескольких штаммов, отличающихся по спектру потребляемых субстратов, сопровождается более полной деструкцией нефти (Кобзев и др., 2001) В условиях природного микробоценоза наблюдается одновременная ассимиляция разных фракций нефти различными группами микроорганизмов (Шкидченко, Аринбасаров, 2001).

Биопрепараты третьей группы имеют более сложную композицию. В их состав входят один микроорганизм или смесь нескольких штаммов бактерий, сорбенты (природные и неприродные), носители, стабилизаторы, консерванты, ферменты, поверхностно-активные вещества (биосурфактанты), органические и минеральные вещества.

Табл. 5. Биопрепараты на основе углеводородокисляющих микроорганизмов

Группа биопрепарата	Препарат для биоремедиации	Входящие в состав препарата микроорганизмы (род/вид/штамм)	Условия применения	Авторы
1	2	3	4	5
I	Бациспецин	*Bacillus* sp.	серая лесная почва с нефтью	Андресон и др., 1992
	Дестройл	*Acinetobacter* sp.	+5 +38˚С pH 4,5 – 8,5	Ихсанов и Ихсанова,2000
	Дизойл-М	*Candida maltosa* ВКПМ У-2256 *Candida maltosa* ВКПМ У-2257	нефтезагрязнения почвы и воды при температуре до 41°С и при pH 3,0-9,0, может работать в засоленных экосистемах	Авчиева, 1997
	Псевдомин	*Pseudomonas putida*	+0 + 34˚С pH 4,8 – 8	Станкевич, 2002
	Средство для деструкции	*Bacillus firmus* SDS-1	нефтяные углеводороды в среде с 24,0% NaCl.	Сопрунова и др., патент на изобретение №2422505
II	Биодеструктор	*Acinetobacter bicoccum*, *Acinetobacter valentis* *Arthrobacter* sp. *Rhodococcus* sp.	+10+ 37˚С pH 4 – 9,5	Мурзаков и др.,1993
	Деворойл	*Rhodococcus* sp. (три вида) *Pseudomonas aeruginosa* *Candida* sp.	+5 + 45˚С pH 4,5 – 9 до 15г/л NaCl	Борзенков и др., 1994
	Консорциум штаммов и способ очистки	*Pseudomonas aeruginosa* НД К3-1 *Pseudomonas fluorescens* НД К3-2	нефтепродукты нефтезагрязненные подземные воды	Максимович, Хмурчик, патент РФ на изобретение №2312719
	Нафтокс	*Mycobacterium phlei* *Pseudomonas aeruginosa* *Rhodococcus species*	очистка почвы от нефти и нефтепродуктов	Белонин и др.,1996

1	2	3	4	5
	Родер	*Rhodococcus rubber* *Rhodococcus erithropolis*	+8 + 35˚С до 100 г/л NaCl	Мурыгина и др.,1999
	Средство для очистки почв	консорциум бактерий *Rhodococcus* sp. SMB37 *Rhodococcus* sp. SMB38 *Arthrobacter* sp. SMB32 *Microbacterium* sp. SMB33 *Thalassospira* sp. SMB34 **?** *Halomonas* sp. SMB31 *Salinicola socius* SMB35	нефть полициклические углеводороды при NaCl до 7%	Назаров и др., патент РФ на изобретение № 2388816
	Экойл	*Mycobacterium flavescens* *Pseudomonas putida* *Acinetobacter* sp.	+5 +37˚С pH 5 – 8,5	Ермоленко и др., 1997
III	Биоойл	*Enterobacter* sp, *Saccharometes* *Bacillus* sp. *Acinetobacter* sp.	+1 + 31˚С pH 4 – 9 до 75 г/л NaCl	Шестопалов и др.,2007
	Биоприн-Б	*Pseudomonas putida* *Pseudomonas fluorescens* *Micrococcus* sp. *Xanthomonas* sp.	очистка объектов окружающей среды от нефти и нефтепродуктов	Саксон и др.,1997
	Биопрепарат	*Arthrobacter* sp. ВКМ Ac-2272 Д *Rhodococcus* sp. ВКМ Ac-2045 Д	очистка почвы и вод от нефти и нефтепродуктов	Карасева, патент на изобретение №2365438
	Биопрепарат	*Arthrobacter* sp. МИА-89 *Arthrobacter* МИА-74 *Arthrobacter* ОС-1	очистка почвы от нефти и нефтепродуктов	Кузнецова и др. патент РФ на изобретение №2299101
	Биопрепарат	*Rhodococcus* *Pseudomonas*	водоемы, загрязненные нефтью или нефтепродуктами	Ботвинко и др., патент РФ на изобретение №2430892

1	2	3	4	5
	Биопрепарат	*Bacillus cereus* *Bacillus subtilis* *Actinomyces griseus* *Actinomyces glaucus* *Pseudomonas fluorescens* *Pseudomonas mesentericus* *Pseudomonas denitrificans* *Arthrobacter globiformis*	очистка почвы и вод от нефти и нефтепродуктов	Сваровская и др., патент РФ на изобретение №2361686
	Биопрепарат	*Burkholderia caryophyllii* НТ-4 *Pseudomonas fluorescens* biovar II НТ-6	очистка вод от углеводородов	Хлыновский и др., патент РФ на изобретение №2455240
	Комплексный биосорбент на основе штаммов бактерий и грибов с микроводорослями	*Rhodococcus equi* Р-72-00 *Rhodotorula glutinis* 2-4М *Trichoderma lignorum* F-98	водные среды, загрязненные нефтью и нефтепродуктами	Шарапова и др., патент РФ на изобретение №2422587
	Композиция	*Pseudoamycolata halophobica* *Kibdelosporangium aridum* *Acinetobacter oleovorum* *Rhodococcus erythropolis*	очистка вод, почв, грунтов от нефтяных загрязнений	Янкевич, патент РФ на изобретение №2270808
	Консорциум штаммов	*Bacillus brevis* ИБ ДТ5-1 *Arthrobacter* sp. ИБ ДТ5-3	вода и почва, нефть и нефтепродукты	Логинов и др., патент РФ на изобретение №2232806
	МикроБак	*Pseudomonas* *Rhodococcus*	+4 + 32˚С до 50 г/л NaCl	Филонов и др.,2006
	Экосорб	*Pseudomonas* *Rhodococcus* *Mycobacterium* *Xantomonas*	дерново-подзолистая и супесчаная почва с нефтью	Чугунов и др., 2000

Форма выпуска биопрепаратов достаточно разнообразна: это может быть эмульсия, суспензия, гель, паста, порошок (Рогозина и др., 2010).

При выборе штамма, перспективного для использования в составе биопрепарата, обычно учитывают такие критерии, как высокая нефтеокисляющая активность, устойчивость к токсикантам (солям тяжелых металлов), непатогенность и нетоксичность штамма для человека и животных (Коронелли, 1996). В связи с тем, что технологии микробиологической очистки загрязненных почв почти всегда предусматривают аэробные условия, целесообразно вести выбор микроорганизма-деструктора среди аэробных или факультативно-анаэробных штаммов. Кроме того, клетки штамма должны обладать высокой жизнеспособностью, чтобы быть способными к росту и утилизации нефтепродукта в условиях широкого диапазона температур, pH среды, влажности, нехватки питательных элементов (Стабникова и др., 1995).

На сегодняшний день существует достаточно много работ, посвященных деградации различных углеводородов микроорганизмами. Анализ отечественной и зарубежной литературы, а также проведенный патентный поиск биопрепаратов для очистки окружающей среды от нефти и нефтепродуктов свидетельствуют о том, что далеко не все авторы учитывают положительные стороны конкурентов-аналогов биопрепаратов. По нашему мнению, при разработке новых более эффективных биопрепаратов необходимо учитывать способности микроорганизмов-деструкторов к деградации высоких концентраций нефтепродуктов в широком температурном и pH диапазоне, синтезу биоэмульгаторов, а также галотолерантность бактерий. Кроме того, известно, что плазмиды биодеградации несут в своем составе гены, кодирующие ферменты деструкции алканов, моно- и полициклических ароматических соединений. Так как нефть – многокомпонентная система, в состав которой также входят алканы, моно- и полициклические ароматические соединения, то, вероятно, присутствие бактерий- хозяев катаболических плазмид в составе биопрепаратов должно увеличивать эффективность деградации нефти и нефтепродуктов. При этом не следует забывать, что максимальный эффект очистки может быть достигнут при совместном применении методов стимуляции аборигенной микрофлоры и интродукции биопрепаратов.

7.4 Проблема сохранения жизнеспособности микроорганизмов в составе биопрепаратов

Повышению выживаемости микроорганизмов при длительном хранении с помощью защитных сред и криопротекторов посвящено значительное количество работ. Однако, поскольку достаточно полного теоретического описания механизмов

защиты пока нет, решение этой проблемы остаётся областью практических исследований для конкретных штаммов микроорганизмов.

При длительном хранении микробной культуры важно сохранить ее высокую жизнеспособность и свойства. При частом пересеве она со временем может изменять свойства за счёт естественной селекции и микромутаций: может уменьшаться продуктивность, появляться гетерогенность культуры (т.е. различные варианты культуры с отличающейся морфологией и физиологией) (Ленгелер с соавт., 2005).

На практике микробные культуры хранят различными способами. Большинство промышленных микроорганизмов можно сохранить в активной форме при низких положительных температурах (2–4°C) в течение 1-2 месяцев. Другим широко применяемым способом консервации является хранение культур в полужидком агаре под слоем минерального масла. Масло предохраняет субстрат от высыхания и ограничивает доступ атмосферного кислорода. Спорообразующие микроорганизмы обладают большой устойчивостью при хранении под маслом, поэтому данный метод наиболее часто используют для бактерий, способных образовывать споры (Ленгелер с соавт., 2005).

Чтобы сохранить свойства культуры без изменений, ее надо хранить в специальных условиях. В основе длительного сохранения культур лежат охлаждение, замораживание или обезвоживание. Во всех этих случаях ограничивается или даже прекращается клеточный обмен веществ. Иногда при замораживании и обезвоживании клетки приводят в состояние анабиоза или преданабиоза. Для длительного хранения промышленных микроорганизмов используют низкие и ультранизкие температуры (Болдырев, 1987). Микроорганизмы замораживают при температуре от -20°C и ниже. В качестве криопротекторов применяют 10-20% глицерин, 7-10% диметилсульфоксид, 10-20%-ную сахарозу. Быструю заморозку и хранение проводят либо в холодильных камерах глубокого охлаждения (кельвинаторах), либо с помощью хладагента (в качестве хладагента обычно используют жидкий азот температурой -196°C). Выживаемость микроорганизмов максимальна, если их хранить в парах жидкого азота или непосредственно в жидком азоте при температуре ниже -130°C. Обычно после 3-5-летнего хранения на холоде выживаемость микроорганизмов составляет 40-70%, после 10-20-летнего хранения – 10-20%. В жидком азоте вынужденно хранят микроорганизмы, не выдерживающие лиофилизации, например некоторые автотрофные бактерии, спирохеты, микоплазмы, водные фикомицеты, различные вирусы (Цуцаева, 1983).

В настоящее время наиболее перспективным методом хранения микроорганизмов является лиофилизация (сублимационная сушка). Процесс лиофилизации заключается в следующем: готовый препарат со стабилизирующей жидкостью (защитная среда или криопротектор) замораживают при температуре от -20 до -70°С. После чего препарат помещают в сушильную камеру, где создается вакуум при помощи вакуумного насоса, при этом вода возгоняется, минуя жидкую фазу, непосредственно изо льда, в результате чего структура препарата не нарушается. При высушивании методом сублимации создаются условия, при которых вещество претерпевает минимальные биохимические изменения. Возможность денатурирования биологически активных веществ при этом сводится к минимуму, благодаря замораживанию. После высушивания под вакуумом скорость окислительных процессов в клетках очень низка, что достигается практически полным обезвоживанием (Долинов, 1969). Это один из наиболее эффективных и экономичных методов длительного хранения микроорганизмов. Лиофилизированные культуры сохраняются в жизнеспособном состоянии десятки лет (Долинов, 1969). Метод лиофилизации удобен для практических целей, так как дает возможность изготовить большое число легких и компактных образцов каждой культуры микроорганизмов, что облегчает рассылку культур потребителям, и, кроме того, которые в процессе хранения в лиофилизированном виде не требуют больших материальных и технических затрат. Однако содержание жизнеспособных клеток микроорганизмов в результате лиофилизации часто оказывается низким. В процессе лиофилизации микроорганизмы подвергаются стрессовому воздействию низких температур и вакуума, что приводит к отбору наиболее устойчивых клеток, которые могут не обладать желаемыми свойствами. Существует ряд неспорообразующих микроорганизмов, которые обычно не переносят сублимационной сушки и не могут быть подготовлены к хранению этим методом. Экспериментальные данные показывают, что в процессе лиофилизации возможно появление мутаций и нарушение генетической стабильности многих видов микроорганизмов. Например, после такой обработки микроорганизмов *P. putida* и *Alcaligenes eutrophus* потери признака, за проявление которого отвечал плазмидный ген катехол-2,3-оксигеназы, составили 99% и возрастали при хранении (Lange, Weber, 1995). Нерман и Фельдблюм (Nierman, Feldblyum, 1984) сообщали о потере плазмид в лиофилизированных культурах *Bacillus subtilis* и *Saccharomyces cerevisiae* после хранения в течение 9 месяцев. В работе Гайик и др. (Gaiek et al., 1994) обнаружены потери более чем 99% активности у лиофилизированной фенолдеградирующей смешанной культуры после 6 месяцев

хранения. Было также показано (Yoon, 2005), что при лиофилизации клеток штамма *Pseudomonas* sp. KM12TC утрачиваются такие признаки, как способность утилизировать фенол и резистентность к ионам мышьяка, что связано с элиминацией плазмид, несущих гены, ответственные за экспрессию данных свойств у микроорганизмов. Несмотря на это, считается, что лиофилизация, в основном, обеспечивает большую стабильность, чем атмосферное высушивание и метод периодических пересевов для широкого круга микроорганизмов, притом, что лиофилизированные клетки могут сохранять жизнеспособность в течение многих лет.

Хранение культур микроорганизмов достаточно распространено, однако, замораживание относится к наиболее стрессовым воздействиям на бактериальную клетку. При замораживании происходит образование льда внутри и снаружи клеток. Характер этих изменений зависит от изучаемого образца, обработки криопротекторами, от скорости охлаждения (Болдырев, 1987). Выбор скорости замораживания очень важен, так как это один из главных факторов, влияющих на повреждения клетки. При исследовании выживаемости различных молочнокислых культур, было обнаружено, что для бактерий с низкой выживаемостью нужно использовать специальные режимы заморозки – с оптимальной, специально подобранной для каждого отдельного вида микроорганизмов скоростью (Santivarangkna et al., 2008).

Условия хранения уже высушенного препарата также играют значительную роль. Одно из основных требований: соблюдение герметичности и низких температур. Окислительное воздействие кислорода воздуха и влажности негативно сказывается на выживаемости микроорганизмов (Miyamoto-Shinohara et al., 2000). Хранение сухого материала без доступа света также способствует сохранению жизнеспособности: трёхчасовое выдерживание лиофилизированной биомассы Escherichia coli на свету (9×10^{-3} В/см^2) приводило к падению выживаемости на два порядка (Israeli et al., 1993).

Для достижения максимальной эффективности при использовании сухих биопрепаратов следует проводить подбор условий их регидратации, так как от этого процесса напрямую зависит, как пройдёт восстановление жизнеспособности бактериальных клеток при поглощении воды (Abadias et al., 2001; Costa et al., 2000).

При изучении выживаемости грамположительных и грамотрицательных бактерий оказалось, что грамположительные более устойчивы к воздействию замораживания и обезвоживания (Miyamoto-Shinohara et al., 2008). Предполагают, что это связано с толщиной пептидогликанового слоя, который значительно тоньше у

грамотрицательных микроорганизмов, что может являться причиной разрыва клеточной стенки.

Для снижения повреждающего действия физико-химических факторов при замораживании используют защитные среды — растворы веществ, называемых криопротекторами. Применяют различные среды, защищающие при замораживании и лиофилизации: сахарозо-декстрановые, сахарозо-поливинилпирролидоновые, лактозные, желатиновые. Обычно, защитные среды подразделяются на две группы: к первой группе относятся среды, в которых снижается интенсивность обезвоживания в период лиофилизации в связи с увеличением концентрации веществ (Долинов, 1969). Это проникающие криопротекторы – низкомолекулярные вещества, которые при использовании проникают внутрь клетки. В эту группу входят: глутамат натрия, лактоза, сахароза. Ко второй группе относят среды, которые не изменяют скорость отдачи воды при высушивании. Этими свойствами обладает крахмал, декстран, желатин, поливинилпирролидон и другие. Но наилучшими средами считают среды, полученные при комбинировании веществ 1 и 2 групп.

Широко известно защитное действие глицерина. При хранении при температуре —10°С с добавлением 15% глицерина микроорганизмы различных родов, в том числе и *Pseudomonas*, оставались жизнеспособными в течение пяти месяцев, как минимум (Howard, 1974). При хранении лиофилизированных клеток *P. fluorescens* и *Salmonella newport* в вакууме в течение пяти лет использование сахарозы, глутамата и семикарбазида обеспечило наибольшую выживаемость микроорганизмов (Betty et al., 1974). В работе Юуна (Yoon, 2005) показано, что использование криопротектора (15% снятое молоко) позволяет значительно увеличить процент клеток, сохранивших после лиофилизации способность к утилизации фенола в присутствии ионов мышьяка. Так как эти свойства кодировались генами, располагавшимися на плазмидах, то можно полагать, что защитные среды влияют не только на выживаемость клеток микроорганизмов, но и на сохранение в них плазмид.

Несмотря на огромную роль криопротекторов в сохранении жизнеспособности микроорганизмов при сублимационной сушке и замораживании, научная сторона этого вопроса ещё недостаточно изучена. Трудности разработки теоретических количественных закономерностей защиты связаны с тем, что механизм защиты очень сложен (Долинов, 1969). Защитные свойства обнаружены у веществ, относящихся к совершенно различным классам соединений. Предполагают, что механизм защиты, по-видимому, мало связан со специфическими особенностями отдельных видов микроорганизмов. Экспериментальные данные показывают, что очень часто среда

высушивания, хорошо защищающая один вид микроорганизмов, эффективна и для других видов. Об этом свидетельствует также и тот факт, что некоторые сахара в одинаковой степени хорошо защищают при хранении как микроорганизмы, ферментирующие их, так и не ферментирующие. Попытки объяснить защитное действие некоторых сред в процессе высушивания были предприняты рядом исследователей. На основании изучения выживаемости культур *Streptococcus pyogenes* и *Escherichia coli*, высушенных в растворах различных веществ (хлорид натрия, глюкоза, сахароза, салициловая кислота, триптофан, крахмал, пептон), было сделано заключение, что выживаемость микроорганизмов при хранении повышается с повышением растворимости кристаллических соединений и повышением гидрофильности коллоидов (Heller, 1941). Как было показано, среды высушивания, содержащие в своем составе сахара, обладают более высокими защитными свойствами, чем те же среды без сахаров. Предполагают, что механизм защитного действия сахаров связан с их способностью удерживать некоторое количество влаги, необходимое для сохранения жизнеспособности микроорганизмов (Leslie et al., 1995). Основанием для такого предположения послужили результаты опытов, в которых выживаемость *Escherichia coli* после длительного хранения была выше в том случае, когда культуру высушивали кратковременно, и ниже – при длительном высушивании (Fry, Greaves, 1951).

Существует другая позиция объяснения защитной роли сахаров (Parkes, 1960). Согласно ей, утрата жизнеспособности высушенными микробами в процессе их хранения является результатом взаимодействия карбонильных групп среды высушивания с аминными группами клеточных белков. Эти реакции, протекающие особенно интенсивно с восстанавливающими сахарами, имеющими свободную карбонильную группу, существенно ускоряются при повышении температуры. Экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что выживаемость микробов, высушенных в средах, содержащих сахара, резко снижается при повышении температуры хранения, согласуются с этим предположением. Нейтрализация карбонильных групп среды высушивания представляется обоснованным методом повышения стабильности препаратов (Conrad et al., 2000). В работе (Betty et al., 1974) на основании результатов факторного анализа был сделан вывод, что взаимодействие карбонильных соединений с клеточными компонентами является основным фактором, влияющим на выживаемость клеток при хранении.

Таким образом, при сочетании двух типов криопротекторов, один предохраняет бактерии от действия замораживания, а другой нейтрализуют карбонильные группы и

препятствует чрезмерному обезвоживанию при лиофилизации (Santivarangkna et al., 2008).

Известны и некоторые другие механизмы защиты бактерий от воздействия низких температур. Было обнаружено (Kawahara, 2002; Ramos et al., 2001), что некоторые бактерии способны синтезировать специфические белки, различным образом влияющие на образование кристаллов льда и служащие для минимизации повреждений клетки при снижении температуры. Очевидно, что использование таких веществ в качестве компонентов защитных сред очень перспективно.

Таким образом, задачи подбора способов и режимов культивирования микроорганизмов, а также выбора условий хранения и поиска эффективных криопротекторов, остаются весьма актуальными и требуют дальнейших исследований.

Глава 8. Фиторемедиационные технологии

Фиторемедиация, т.е. использование растений и ассоциированных с ними микроорганизмов для очистки и восстановления загрязнённой окружающей среды, является эффективным и дешёвым методом, включающим такие процессы как ризоремедиация, фитостабилизация, фитоэкстракция, фитоволатилизация (Рис. 8 и 9) (Siunova et al., 2011; Salt et al., 1998; Pilon-Smits, 2005). Термин фиторемедиация (фито – растение + ремедиация – восстановление) имеет не очень давнюю историю. Впервые его использовал американский ученый И. Раскин в 1994 г. (Raskin et al., 1994). Фиторемедиация предполагает удаление токсичных соединений из почвы, грунтовых вод и водоемов при помощи почвенных микроорганизмов и растений. Численность микробных популяций в ризосфере растений (области непосредственно вокруг корней растений) часто значительно выше, чем в той же почве без растений (Lynch and Whipps, 1990; Anderson and Coats, 1995). Особенно эффективными следует считать фиторемедиационные технологии при оздоровлении почв на больших площадях, когда из почвы происходит постепенное удаление токсичных соединений за счёт жизнедеятельности как растений, так и микроорганизмов. При этом не нарушается структура почвы и даже состав ризосферных микроорганизмов остается неизменным. Интересно провести параллель и отметить некоторую специфику детоксикационных возможностей растений и микроорганизмов, поскольку их совместное действие часто носит симбиотический характер. В обоих случаях органические токсиканты усваиваются и ассимилируются, т.е. подвергаются метаболической (окислительной) деградации, причем в этом процессе микроорганизмы ввиду их быстрого роста, характерных им сравнительно легко саморегулируемых адаптационных и

индуктивных процессов, а также широкого спектра генетической информации следует признать более активными «детоксикационными агентами», чем растения. Также следует учитывать феномен, получивший название «гормезиз», когда малые дозы поллютанта стимулируют рост растений, а большие дозы – наоборот, ингибируют его (Calabrese and Blain, 2009).

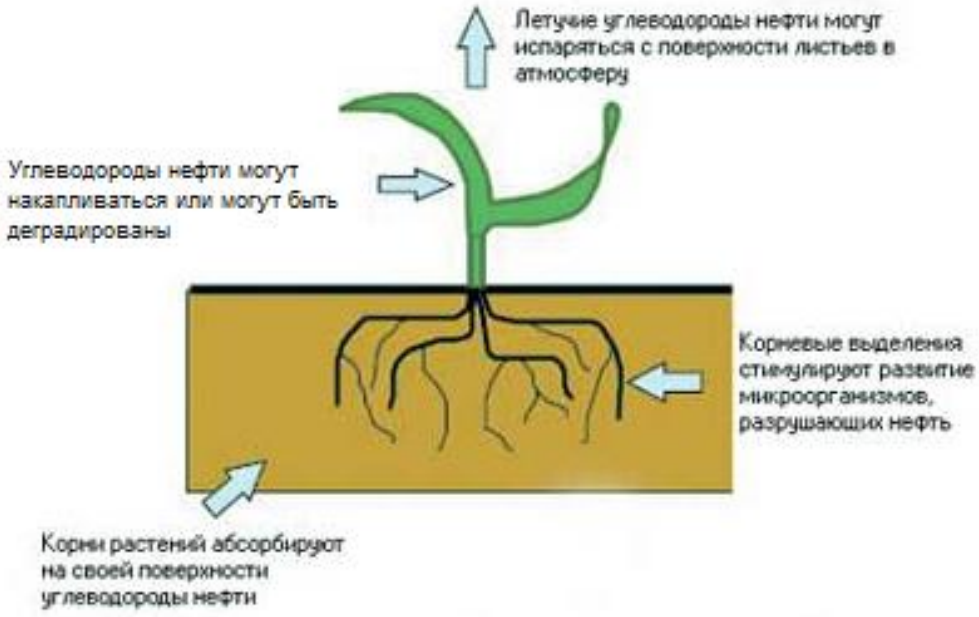


Рис.8. Основные механизмы фиторемедиации почвы, загрязненной нефтью или нефтепродуктами.

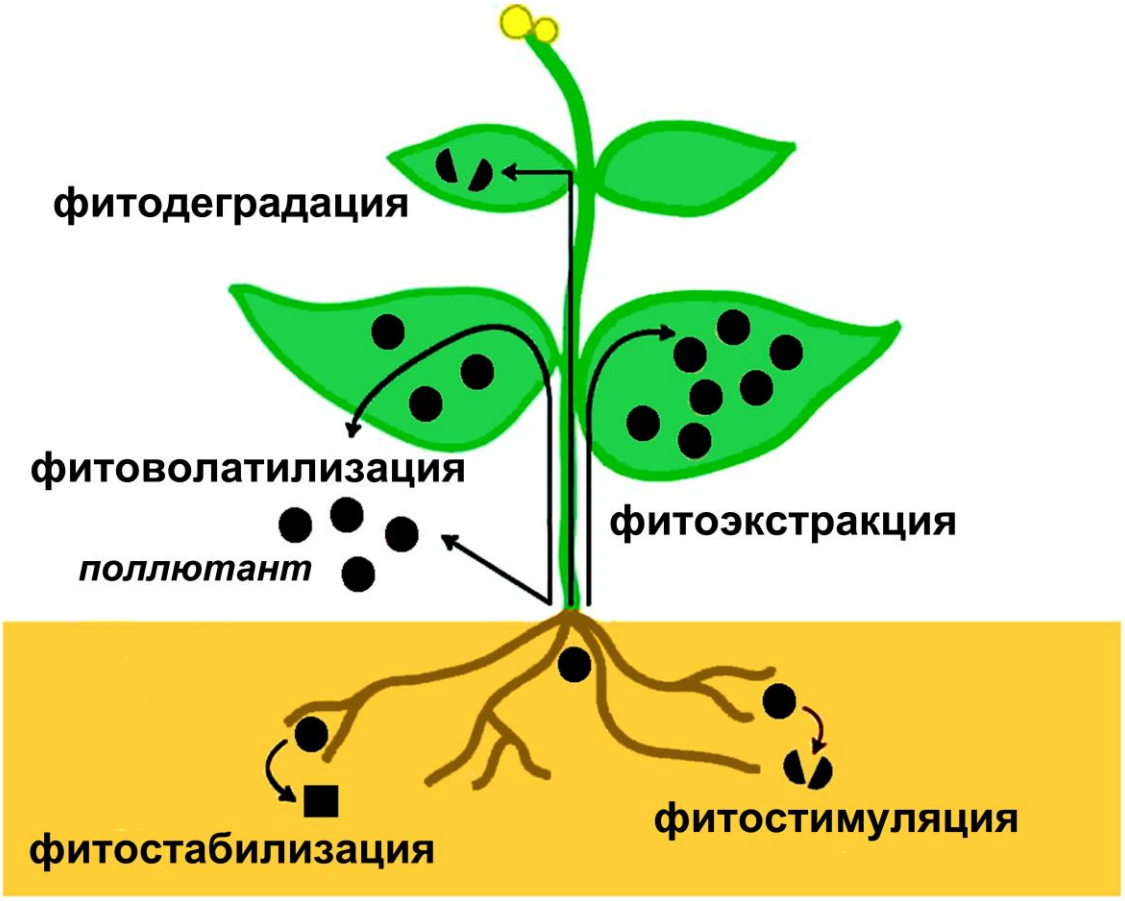


Рис. 9. Основные механизмы фиторемедиации почвы (по Pilon-Smits, 2005).

Современные фиторемедиационные технологии могут основываться на разных методологических подходах в зависимости от того, какая ставится задача, какова природа токсиканта, его концентрация. Зачастую, сам объект, нуждающийся в ремедиации (участок почвы, водохранилище, земельный участок близ химического завода, бывший военный полигон и др.), определяет форму и разнообразие возможных фиторемедиационных технологий. Естественно, не следует рассматривать фиторемедиацию как всемогущее средство, способное быстро и дешево избавить объект от любой формы загрязнения. Так, например, растения не способны ассимилировать полихлорированные бифенилы и диоксины - соединения, которые, к сожалению, в последнее время все больше загрязняют биосферу. Современная фиторемедиационная технология располагает следующими инструментами: фитоэкстракция, ризофильтрация, ризодеградация, фитодеградация, фитоволатилизация (испарение при помощи растений), гидравлический контроль и др. (Siunova et al., 2011), которые будут рассмотрены в настоящей главе. Прежде чем использовать ту или иную технологию или подход, следует провести тщательный анализ объекта, подлежащего ремедиации, установить тип загрязнителя, его

концентрацию, глубину проникновения токсиканта в почвы, тип почвы, предполагаемое количество осадков в период фиторемедиации, наличие грунтовых вод, глубину, на которой они находятся, и т.п. Только после этого выбирается метод фиторемедиации, включая селективный отбор растений и микроорганизмов, требуемых для каждой конкретной технологии.

8.1 Фитоэкстракция

Фитоэкстракция, синоним фитоаккумуляция – усвоение растениями загрязнителей из окружающей среды с накоплением их в биомассе (Назаров А.В., Иларионов С.А., 2005). Данный термин в основном используется по отношению к тяжелым металлам, а также ряду других химических элементов. Технологическая особенность фитоэкстракции заключается в следующем: корневой системой растений вместе с питательными веществами поглощаются как неорганические, так и органические токсиканты и осуществляется их последующая транслокация в наземные органы растений. По завершению фазы роста и транслокационных процессов они удаляются и подлежат соответствующей переработке. Биомасса растений может быть использована как источник для выделения тяжелых металлов. С этой целью растения сжигают и из золы восстанавливают тяжелые металлы (Г.И. Квеситадзе с соавт., 2005). К настоящему времени определены растения-супераккумуляторы металлов: сарептская горчица, люцерна, подсолнечник (*Helianthus annuus*), сорго, ряд травянистых и некоторые зерновые культуры.

8.2 Ризофильтрация

Ризофильтрация, по своей сути представляет собой адсорбцию и последующий транспорт токсикантов корнями растений. Как технология ризофильтрация объединяет биотические и абиотические процессы. При помощи богатых органикой экссудатов корневой системы растений на корнях происходит адсорбция и иммобилизация органических компонентов почвы, включая токсичные соединения, последующий транспорт которых в основном, определяется химической природой самих токсикантов. Как правило, экссудаты регулируют кислотность ризосферы, создавая подходящие условия для адсорбции почвенной органики на корневой системе растений (Назаров А.В., Иларионов С.А., 2005).

Способность растений создавать микросреду вокруг корневой системы, которая способствует концентрированию и проникновению компонентов почвы в растительные ткани - это то уникальное свойство, которым растения отличаются от

всех остальных организмов. В технологиях, действующих по принципу ризофильтрации, используют быстрорастущие, интенсивно образующие биомассу и имеющие хорошо развитую корневую систему многолетние растения (горчица сарептская (*Brassica juncea*), уруть колосистая (*Myriophyllum spicatum*), подсолнечник однолетний (*Helianthus annuus*), японская газонная трава (*Japanese lawngrass*), ряска (Lemna minor)) (Raskin et.al.,1994; Salt D.E. et.al., 1995). Очевидное преимущество ризофильтрационной технологии заключается в ее дешевизне и возможности использовать обычные растения, не нарушая в процессе обработки почвы ее структуру (Г.И. Квеситадзе с соавт. 2005). Высушенные, сожженные или компостированные остатки растений, содержащие повышенные концентрации загрязнителей, после их аккумуляции, сорбции или осаждения утилизируются или перерабатываются (Назаров А.В., Иларионов С.А., 2005).

8.3 Фитодеградация

Фитодеградация, называемая также фитотрансформацией, - несомненно, один из основных и наиболее важных технологических приемов фиторемедиации. Фитодеградация основана на возможности растений осуществлять ферментативную (чаще всего окислительную) деградацию органических токсикантов путем характерных для растительных клеток метаболических превращений. При этом, очевидно, происходит удаление из почвы и неорганических токсикантов. Фитодеградация, осуществляемая растениями в комбинации с ризосферными микроорганизмами, часто применяется на практике, как основной компонент фиторемедиации. Микроорганизмы первыми атакуют трудно поддающиеся фитодеградации структуры токсикантов. В зависимости от почвы, состава сообществ ризосферных микроорганизмов, вегетационных процессов растений и других факторов, влияющих на набор и активность внеклеточных ферментов, чаще всего в почве обнаруживаются и активно действуют лакказы (К.Ф. 1.14.18.1), пероксидазы (К.Ф.1.11.1.7), дегалогеназы (К.Ф. 3.8.11), дегидрогеназы (К.Ф. 1.2.1.), нитроредуктазы (К.Ф.1.6.6), которые активно принимают участие в начальных реакциях трансформации токсикантов, способствуя их проникновению в растения.

Фитодеградация оказалась эффективной в случаях токсичности почв, загрязненных высокими концентрациями алифатических, ароматических и полициклических углеводородов, фенолов, гербицидов, тринитротолуола (ТНТ) и других соединений. Фитодеградация используется и при очистке почв от твердых и жидких поллютантов (Г.И. Квеситадзе с соавт. 2005). На практике лучшие

фитодеградационные характеристики проявили однолетние растения (овсяница, хрен, люцерна), древесные растения (дуб, кипарис, ива, тополь), а также водоросли. В фитодеградационных технологиях обязательно должна учитываться возможность ингибирования роста некоторых растений под действием химических соединений, образованных другими растениями. Этот эффект известен под названием аллелопатии. Особенно часто аллелопатию можно наблюдать во время вегетационных процессов на плантациях с самыми разными растениями.

8.4 Фитоволатилизация

Фитоволатилизация – испарение усвоенного растением из почвы или воды загрязнителя с выделением его в измененном или неизменном виде в атмосферу, после чего он рассеивается до безопасных концентраций или подвергается фотоокислению. Данный процесс эффективен в отношении селена и ртути. Часть селена, поступив в растение, метилируется, образовавшийся при этом метилселенат испаряется растением путем транспирации в воздух. Процесс фитоволатилизации показан и для органических загрязнителей: бензола, толуола, м-ксилена, нитробензола, этилбензола (Назаров А.В., Иларионов С.А., 2005). Среди растений, используемых для фитоволатилизации, следует назвать тополь, люцерну, акацию, травянистые растения (Г.И. Квеситадзе с соавт. 2005).

8.5 Фитогидравлика

Технологию гидравлического контроля уровня воды и содержания токсикантов, осуществляемого растениями, называют фитогидравликой. Метод в основном предназначен для очистки грунтовых вод, очень часто имеющих жизненно важное значение. Часто для фитогидравлических технологий используют древесные растения с хорошо развитой корневой системой, которые вместе с водой «вытягивают» из грунта и широкий спектр органических и неорганических токсичных соединений, что, собственно, и составляет сущность этих технологий. Из технологических соображений наиболее подходящими растениями для этих целей оказались тополь, береза, ива, эвкалипт и другие лиственные растения. Успешное практическое осуществление фитогидравлических технологий в значительной степени определяется климатом (Г.И. Квеситадзе с соавт. 2005).

8.6 Ризодеградация

Ризосферная деградация – процесс деструкции органических загрязнителей ассоциированными с корнями растений микроорганизмами: обычно в этом процессе участвует микрофлора ризосферы и микоризные грибы (Назаров А.В., Иларионов С.А., 2005). Как известно, корни растений активно выделяют экссудаты – внеклеточную жидкость, содержащую ферменты, сахара, аминокислоты, органические кислоты, жирные кислоты, стимуляторы роста, нуклеотиды, различные вторичные метаболиты и т.д. Эти компоненты создают определенное микроокружение в зоне корневой системы и меняют pH среды, обеспечивая оптимальные условия для размножения ризосферной микрофлоры. Сахара, органические кислоты и различные высокомолекулярные органические соединения составляют от10 до 50% всех продуктов фотосинтеза и имеют тенденцию накапливаться в почве (Kumar et al., 2006), являясь питательными субстратами для микроорганизмов. Кроме того, корни подготавливают питательные компоненты и другие субстраты, повышая эффективность их усвоения и, по возможности, при помощи экссудатных ферментов, осуществляя деградацию органических субстратов, находящихся в почве, в более низкомолекулярные и легкоусвояемые растениями соединения. Ризодеградационные технологии используют в тех случаях, когда токсикантами являются углеводороды, нефтепродукты, толуол, бензол, этилбензол, ксилол, полиароматические соединения, антрацен, пирен, атразин, хлорметил, 2,4-дихлорфеноксиацетат и другие гербициды, пентахлорфенол и др. Таким образом, совместное действие растений и микроорганизмов, кроме симбиотического эффекта, существенно усиливающего детоксикационный процесс, удачно используется в разных технологических приемах. Как было показано на практике, к активным ризодеградационным растениям могут быть отнесены люцерна, соя, бобовые, рис, подавляющее большинство кустарниковых растений, шелковица, ель обыкновенная и ряд других однолетних и многолетних растений. Некоторые авторы считают, что ризодеградация является интегральным и наиболее существенным компонентом фиторемедиации, она происходит в природе, но может быть усилена путём интродукции активных штаммов-деструкторов поллютантов и микроорганизмов, стимулирующих рост растений (Gerhardt et al., 2009).

8.7 Роль микроорганизмов в процессе фиторемедиации загрязненной окружающей среды

Многими исследованиями установлено положительное влияние микробно-растительных комплексов на очистку окружающей среды от полициклических ароматических углеводородов, синтетических поверхностно-активных веществ, нефти, хлорорганических, нитроароматических и фосфорорганических соединений, а также от других органических загрязнителей (Kumar et al., 2006; Gerhardt et al., 2009; Megharaj et al., 2011; Siunova et al., 2011). Отсутствие влияния или даже замедление разложения ряда природных веществ или ксенобиотиков в присутствии растений описано в относительно небольшом количестве литературных источников.

Существует несколько процессов, за счет которых микробно-растительные системы воздействуют на рекультивацию загрязненных экосистем.

8.7.1 Повышение численности микроорганизмов под влиянием растений

Вблизи растений под влиянием их выделений и опада формируется повышенное количество экрисотрофных и сапротрофных микроорганизмов, утилизирующих поступающие органические вещества. Предполагается, что благодаря метаболизму растений в окружающую среду попадают самые различные соединения (так называемые вторичные метаболиты растений), в том числе структурно сходные с некоторыми поллютантами и ксенобиотиками (Singer et al., 2004), например углеводороды и углеводородоподобные вещества (терпены, терпеноиды, вещества, входящие в состав кутикулы), а также фенолы. В связи с этим ассоциативная микрофлора в той или иной степени адаптирована к деструкции таких загрязнителей. Kim et al. (2003) продемонстрировали, что такие вторичные метаболиты растений как лимонен, цимен, карвон и пинен стимулируют деградацию полихлорбифенилов в почве. Кроме того, растения вступают в симбиоз с микоризными грибами, но поражаются паразитическими микроорганизмами; растительные ткани обычно заселены эндофитными грибами и бактериями.

Так, в ризосфере и на поверхности корней (ризоплане) за счет корневых экссудатов численность микроорганизмов на один, а часто и на несколько порядков выше, чем в почве в отсутствие растений. Как правило, численность микроорганизмов, способных к деструкции загрязнителя, в ризосфере растений также существенно больше, чем вне ее: например, численность углеводородокисляющих бактерий может быть выше до 10 раз, а численность бактерий, разрушающих бензол, толуол и ксилол – до 5 раз.

К деструкции ароматических углеводородов и некоторых других поллютантов способны природные и генетически модифицированные штаммы клубеньковых азотфиксирующих бактерий, содержащие плазмиды биодеградации. Однако их способность к очистке загрязненной почвы в симбиозе с бобовыми растениями изучена мало.

8.7.2 Стимуляция микробной активности в ризосфере

Повышенная скорость деструкции ксенобиотиков в ризосфере может быть также обусловлена выделениями растений. Предполагается, что содержащиеся в них легкодоступные вещества (аминокислоты, углеводороды, органические кислоты) повышают разложение органических загрязнителей микроорганизмами за счет их кометаболизма. Кроме того, в корневых выделениях могут содержаться кофакторы ферментов, необходимых для окисления поллютантов. Однако, присутствие легкоусваиваемых соединений в корневых выделениях может замедлить деструкцию трудноразлагаемых ксенобиотиков из-за эффекта катаболитной репрессии.

Микробная деградация органических поллютантов часто лимитируется недостатком кислорода, воды и питательных элементов в загрязненной среде. При этом вблизи растений данные показатели часто более благоприятны. Постоянный рост корней растений приводит к рыхлению почвы, в связи с чем, улучшается ее водный и воздушный режим. Вода поступает в прикорневую зону и с корневыми выделениями. Некоторые растения могут транспортировать кислород через воздухоносную ткань – аэренхиму, из которой он диффундирует в среду с затрудненным газообменом. Обогащение почвы азотом с помощью бобовых растений и клубеньковых азотфиксирующих бактерий, более интенсивные в ризосфере, чем в почве без растений, процессы азотфиксации, мобилизации и минерализации фосфора и других элементов из нерастворимых соединений также могут стимулировать микробную активность и ускорить разложение поллютантов (Назаров и Иларионов, 2005). Создание более благоприятных условий в ризосфере растений ослабляет негативное влияние токсичных веществ на прикорневую микрофлору. Так, видовой состав, численность микроорганизмов, а также микробиологическая активность в ризосфере растений, выросших на загрязненной хлорорганическими ксенобиотиками почве, была гораздо выше, чем в почве без растений. Аналогичные результаты получены при загрязнении почвы битумом. Кроме того, растение может усваивать продукты разложения органических поллютантов, усиливая их деградацию как прямо, так и

косвенно, снимая ингибирование синтеза микробных ферментов продуктами распада ксенобиотиков.

8.8 Популяционные взаимодействия микроорганизмов

В природе организмы существуют в совокупности с другими организмами различных видов. Когда один или более типов организмов оказывают взаимное влияние друг на друга, то это явление называется взаимодействием. Взаимодействия классифицируют на основе взаимного влияния популяций, таких как позитивные и негативные взаимодействия. Позитивные взаимодействия между биологическими популяциями увеличивают способность взаимодействующих популяций к выживанию внутри сообщества отдельно взятого ареала. Мутуалистические и синергистические взаимодействия являются позитивными взаимоотношениями между биологическими видами. С другой стороны, негативные взаимоотношения между популяциями действуют как механизмы ответной реакции, которые лимитируют численность популяции. В некоторых случаях, негативные взаимоотношения могут приводить к элиминации популяции, что отрицательно влияет на дальнейшее существование сообщества организмов данного места обитания. Взаимодействия, связанные с негативной ответной реакцией лимитируют численность популяции и обеспечивают механизм саморегуляции, который является длительной выгодой для всей популяции, так как это предотвращает перенаселенность и уничтожение ресурсов данного места обитания. Негативные взаимоотношения так же способствуют предотвращению вмешательства неаборигенной популяции в устоявшееся микробное сообщество, состоящее из аборигенных популяций, таким образом, поддерживая стабильность сообщества (http://www.microbiologyprocedure.com/population-interactions/microbial-interactions.html).

8.9 Растительно-микробные взаимодействия

Позитивные и негативные взаимоотношения имеют место не только в микробных популяциях, но также между микроорганизмами и растениями. Ризосфера – зона, в которой наблюдаются преимущественно комменсализм и мутуализм между микробами и растениями. Экто - и эндомикоризные грибы снабжают растения минеральными веществами и водой, получая взамен продукты фотосинтеза. В неблагоприятных условиях эти мутуалистические ассоциации могут быть необходимы для выживания растений. Ассоциации азотфиксирующих бактерий с определенными растениями способствуют накоплению азота, особенно необходимого для роста

зерновых культур. Надземные поверхности растений обеспечивают местами обитания большое число комменсальных микробов. С другой стороны, определенные вирусы, бактерии и грибы могут быть причинами заболеваний у растений, которые могут приводить к большим метаболическим потерям и дефициту питательных веществ. Некоторыми позитивными взаимоотношениями между растениями и микроорганизмами являются: синергизм, который затрагивает ризосферу, ризоплан, филосферу и спермосферу растений, и мутуализм, который включает взаимодействие в корневых клубеньках, листьях, а также микоризные взаимодействия. Микроорганизмы спермосферы, формирующие нормальную флору вокруг прорастающих семян, оказывают положительное влияние за счет продукции гормонов роста. Прорастающие семена выделяют определенные химические вещества, которые могут оказывать влияние на качество и количество микробов вблизи семян.

Структура корневой системы растений способствует созданию ризосферной микробной популяции. Взаимодействия корней и ризосферных микроорганизмов основано в большей степени на модификации почвенной окружающей среды посредством таких процессов, как поглощение воды растениями и выделение химических органических соединений корнями. Влияние корней растений на ризосферные микроорганизмы в значительной степени регулируется корневыми экссудатами. Корневые экссудаты включают в себя простые сахара, такие как глюкоза и фруктоза; ди-, три- и олигосахариды; аминокислоты, такие как аланин, серин, лейцин, валин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты, причем две последние продуцируются в больших количествах; витамины тиамин и биотин; флавоны и ауксины; различные стимуляторы/ингибиторы отдельных микробов. Все эти компоненты корневых экссудатов оказывают влияние на микробный метаболизм. Некоторые азотфиксирующие бактерии, такие как *Azospirillum, Azotobacter* используют корневые экссудаты как источник энергии для фиксации азота. Таким образом, происходит определенное селективное влияние корневой системы на микробную популяцию. Например, в области корней происходит преимущественно стимуляция грамотрицательных неспорообразующих палочек. Кроме того, корневые экссудаты содержат токсичные соединения, такие как гликозиды и синильная кислота, и могут ингибировать рост патогенных микроорганизмов. Продуцирование сидерофоров является другой важной характерной особенностью ризосферной микрофлоры. Многие микроорганизмы реагируют на снижение доступности железа в почве, путем синтеза внеклеточных низкомолекулярных агентов - сидерофоров, с помощью которых осуществляется перенос железа. Сидерофоры избирательно

создают комплексы с железом и доставляют его в живую клетку. Они также действуют как факторы роста или антибиотики. Например, штамм *Pseudomonas fluorescens*, продуцирующий сидерофорный компонент, ингибирует рост патогена *Erwinia caratovora* путем хелатирования железа (http://www.microbiologyprocedure.com/population-interactions/microbial-interactions.html).

Микробные популяции оказывает различное влияние на рост растений: стимуляция роста происходит за счет выделения ростовых факторов, таких как ауксины и гиберелины. К микроорганизмам, которые продуцируют такие факторы, относятся представители родов *Arthrobacter*, *Pseudomonas* и *Agrobacterium*. Продукция индолилуксусной кислоты (ИУК) растительного гормона роста, определенными группами микроорганизмов повышает скорость прорастания семян и развития корневых волосков. Внеклеточные продукты определенных микроорганизмов могут приводить к росту других микроорганизмов, что может создавать «улучшенную» ризосферную микрофлору. Микробные экзометаболиты могут также ингибировать рост патогенов, таким образом, защищая растения.

Разнообразие факторов окружающей среды, в том числе и негативных, таких как неконкурентоспособность штаммов-деструкторов поллютантов по сравнению с другими почвенными микроорганизмами, недостаточная метаболическая активность микроорганизмов в условиях лимитирования и ингибирования, гетерогенность загрязнителей и их токсическое действие (Gerhardt et al., 2009) делают необходимым сочетание фиторемедиации с другими биоремедиационными стратегиями (Megharaj et al., 2011). Такой комплексный подход может обеспечить наиболее эффективную и полную очистку окружающей среды от антропогенных загрязнений.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Бактериальные штаммы

В работе использовали более 220 штаммов микроорганизмов из коллекции лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН им. Г.К. Скрябина г. Пущино (из которых 72 штамма бактерий были выделены из почвенных образцов, загрязненных нефтепродуктами и отходами химического производства в процессе данной работы) и 10 бактериальных штаммов из коллекции ЗАО «Биоойл», выделенных из территорий загрязненных нефтью и нефтепродуктами. Штамм *Pseudomonas putida* KT2442 любезно предоставлен профессором Корнелией Смалла (Германия), штамм *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 предоставлен профессором Люхтенбергом (Нидерланды), штамм *P. putida* G7(NAH7) получен от И. Гунзалуса, США.

2.1.1. Питательные среды, источники углерода и энергии, антибиотики

В качестве минимальных сред использовали: 1) среду Эванса (Evans et al., 1970) следующего состава (г, мл/л): K_2HPO4 -8,71 г, 5М р-р NH_4Cl - 1мл, 0,1 М р-р Na_2SO_4 - 1 мл, 62 мМ р-р $MgCl_2$ - 1мл, 1мМ р-р $CaCl_2$ - 1мл, 0,005 мМ р-р $(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$ - 1 мл, микроэлементы - 1 мл, pH 7,0. Состав раствора микроэлементов в 1% HCl, (г/л): ZnO - 0,41, $FeCl_2\cdot 6H_2O$ - 5,4, $MnCl_2\cdot 4H_2O$ - 2,00, $CuCl_2\cdot 2H_2O$ - 0,17, $CoCl_2\cdot 6H_2O$ - 0,48, H_3BO_3 - 0,06; 2) среду Э-1 (Ylihonko et al., 1994) следующего состава (г/л): $K_2HPO_4\cdot 2H_2O$ – 4,8 г/л, KH_2PO_4 – 1,5 г/л, $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0 г/л, $MgSO_4\cdot 7H_2O$ – 0,2 г/л, глюкоза – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 0,1 г/л, микроэлементы ($CaCl_2\cdot 2H_2O$ – 2,0 г/л, $MnCl_2\cdot 4H_2O$ – 0,4 мг/л, $NiCl_2\cdot 6H_2O$ - 0,4 мг/л, $ZnSO_4$ – 0,4 мг/л, $FeCl_3\cdot 6H_2O$ – 0,2 мг/л, $Na_2MoO_4\cdot 2H_2O$ – 0,2 мг/л). Для получения агаризованной среды добавляли 2% (вес/объем) агара («Difco» , США).

В качестве полноценных сред использовали агаризованные среды: Лурия-Бертани (ЛБ) (Sambrook et al., 1989), содержащую (в г/л): бакто-триптон («Difco» , США) – 10 г, дрожжевой экстракт («Difco», США) – 5 г, NaCl – 10 г; среду Кинга Б (КБ) (King et al., 1954), содержащем (в г/л): K_2HPO_4 – 1,5 г, $MgSO_4$ - 1,5 г, глицерин – 8 мл; триптозно-соевый агар (ТСА, «Difco», США) и агар для выделения псевдомонад («Difco», США). Посевной материал выращивали на минеральной среде Эванса с соответствующим субстратом.

В качестве источника углерода и энергии в среду Эванса добавляли дизельное топливо, нефть, мазут; нафталин, фенантрен, ксилол, 2-метилнафталин, бензол, этилбензол, крезол, сукцинат, толуол, камфару, 1-гидрокси-2-нафтоат, салицилат, бифенил, гентизат, о-фталат, бензоат (ароматические соединения); октан, декан,

нонан, гексадекан (*н*-алканы). При выращивании бактерий на минеральной агаризованной среде нафталин, фенантрен, камфару, крезол, 2-метилнафталин, 1-гидрокси-2-нафтоат и бифенил наносили на крышку чашки Петри; сукцинат, салицилат, гентизат, о-фталат, бензоат и глюкозу вносили в среду до конечной концентрации 1 г/л; дизельное топливо, октан, декан, нонан, ксилол, бензол, этилбензол, толуол и гексадекан в количестве 200 мкл вносили в кольцевые силиконовые шланги, которые затем помещали на крышку чашки Петри.

Культивирование штаммов *Rhodococcus* и *Pseudomonas* в ферментёре АНКУМ-2М (ИБП РАН, г. Пущино, Россия) объёмом 10 л проводили с коэффициентом заполнения 0,6. Ферментёр был оснащён механической мешалкой, фильтрами тонкой очистки воздуха, датчиками температуры, кислотности среды, скорости перемешивания и расхода воздуха на аэрацию.

Посевную культуру для всех ферментаций выращивали на среде Эванса с нафталином (для *P. fluorescens* 142NF) или дизельным топливом (ДТ) (для *Rhodococcus* sp. S67) в течение 24 часов.

Для культивирования микроорганизма *P. fluorescens* 142NF была выбрана полусинтетическая среда КГКДА следующего состава: кислотный гидролизат казеина – 10 г/л; дрожжевой автолизат – 70 мл/л; $(NH_4)_2SO_4$ – 6 г/л; K_2HPO_4 – 2 г/л; глюкоза – 20 г/л; $MgSO_4$ – 0,3 г/л; $MnSO_4$ – 0,05 г/л; пеногаситель «СОФЭКСИЛ-1520» (20% водно-масляная эмульсия полиметилдисилоксана, «Софэкс-Силикон», Россия) – 1 мл/л; водопроводной воды до 6 л. В качестве добавок использовали или салицилат натрия (содержание 0,2 г/л), или дизельное топливо (0,45 мл/л).

Режим культивирования: температура 28°С; число оборотов мешалки 450 об/мин; кислотность среды pH 6,8±0,2 (поддерживалась автоматически, добавлением в среду 12% раствора аммиака); аэрация воздухом 3 л/мин от 0 до 4 часов роста, затем и до конца процесса – 6,0 л/мин.

Условия культивирования микроорганизмов штамма *Rhodococcus* sp. S67 были выбраны сходные с условиями культивирования псевдомонад. Состав среды отличался содержанием кислотного гидролизата казеина – 5 г/л; дрожжевого автолизата – 100 мл/л и наличием пептона – 5 г/л. В середине экспоненциальной фазы роста вносили добавку ДТ (1 мл/л).

Режим культивирования был аналогичен режиму выращивания культуры псевдомонад, за исключением кислотности среды (pH=7,0±0,2) и аэрации (3 л/мин от 0 до 8 часов роста, затем 6,0 л/мин).

Для выращивания смешанной культуры *P. fluorescens* 142NF и *Rhodococcus* sp. S67 были выбраны условия культивирования, аналогичные условиям культивирования родококков. Засев штамма P. fluorescens 142NF через 12 часов после начала процесса, одновременно добавляли 6 г/л глюкозы.

Получение концентрированной суспензии микроорганизмов производили путём центрифугирования в течение 30 мин. на центрифуге К70 («Janetzki», Польша) при скорости 5000 об/мин. при 4°С.

Антибиотики отечественного производства добавляли в ЛБ-агар до конечной концентрации (мкг/мл среды): ампициллин 500 и 1000, тетрациклин 10 и 20, стрептомицин 50 и 100, канамицин 50 и 100, клафоран 50 и 100, рифампицин 50 и 100, бензилпенициллин 50 и 100, гентамицин 10 и 20, триметаприм 50 и 100, неомицин 50 и 100, бензилпеницилин 50 и 100, стрептомицин 50 и 100, налидиксовая кислота 50 и 100, гентамицин 50 и 100, новобиоцин 50 и 100, клафаран 50 и 100, цефазолин 50 и 100.

Для приготовления сред с диспергированным углеводородным субстратом (нефть, мазут) использовали ультразвуковой дезинтегратор MSE, Великобритания. Для этого в колбы объёмом 300 мл вносили 150 мл среды Эванса, добавляли 3 г агара и 1,5 г нефти (или мазута). После стерилизации ещё горячую среду диспергировали на ультразвуковом дезинтеграторе при максимальной амплитуде. Время диспергирования – 3 мин для нефти и 4 мин для мазута. При необходимости диспергирование повторяли несколько раз. Полученную таким образом агаризованную среду с диспергированным углеводородным субстратом сразу же разливали в чашки Петри. Посев производили так же, как и на стандартные агаризованные среды.

2.1.2. Условия культивирования

С целью определения способности микроорганизмов к росту на различных субстратах на среде Эванса при различных температурах, в присутствии повышенной концентрации соли (3, 5, 7 и 10%) и на средах ЛБ, КБ и ТСА в присутствии антибиотиков штаммы высевали на соответствующие агаризованные среды, используя метод отпечатков (Практикум по микробиологии, под ред. Нетрусова А.И., 2005).

Культивирование штаммов в жидких средах проводили в колбах Эрленмейера со 100 мл минимальной среды Эванса с добавлением нефти (Уфимская нефть (Табл. 6) или нефть с Московского нефтеперабатывающего завода «Капотня») или дизельного

топлива (летний вариант) до конечной концентрации 2%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40% весовых (по объёму). Инокулирование колб проводили суспензией микроорганизмов (посевная доза 1-5×10^7 кл/мл). После засева колбы помещали на круговую качалку (120 об/мин) и выращивали микроорганизмы в течение 7 - 30 суток при 24°С и в течение 10 - 30 суток при 2-4°С.

Табл. 6. Химический состав уфимской нефти

Фракция	Лёгкие фракции	Твёрдые парафины	Парафино-нафтены	Моно-, биароматические углеводороды	Полициклические ароматические углеводороды	Спирто-бензольные смолы	Асфальтены
Содержание, %	41,27	14,04	12,75	5,76	9,39	10,28	6,50

2.2. Определение эффективности очистки нефтезагрязненных систем

Для исследования эффективности очистки загрязненной территории от нефти микроорганизмами-деструкторами использовали следующие методы: 1) метод гравиметрического анализа для определения общего содержания углеводородов; 2) метод инфракрасной спектроскопии (ИК-спектроскопии) в соответствии с ПНД Ф 14.1:2:4.168-2000 для определения общего содержания углеводородов; 3) метод жидкостно-адсорбционной хроматографии для определения изменения фракционного состава нефти.

2.2.1. Гравиметрический метод анализа

Деградацию нефти исследуемыми штаммами оценивали по суммарному показателю убыли нефти в жидкой среде, определяемому весовым методом (гравиметрия) (Другов и Родин, 2007). Остаточную нефть экстрагировали из культуральной среды (50 мл) хлороформом (2:1), экстракт отделяли центрифугированием в течение 30 мин при 4000 об/мин и высушивали перемешиванием над 3 г безводного сульфата натрия. Для удаления хлороформа пробирки с 5 мл экстракта 3,5-4 ч выдерживали при 70-75°С, затем при 35-40°С в течение ночи и взвешивали. Степень деструкции нефти весовым способом определяли с учетом данных, полученных для контроля (Рк), по формуле:

$$D,\% = \frac{P_k - P_i}{P_k} \cdot 100\%$$

2.2.2. Определение общего содержания углеводородов нефти и нефтепродуктов (дизельное топливо) методом инфракрасной (ИК) -спектроскопии

Метод ИК-спектроскопии позволяет определить содержание углеводородов по количеству С-С, С-Н связей. Диапазон чувствительности метода составляет 0,02-2 мг/л. Углеводороды нефти для анализа концентрировали путём экстракции четыреххлористым углеводородом (ЧХУ) из исследуемых проб и измерение данных проводили на приборе АН-2.

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

В случае выхода концентрации углеводородов в определяемом образце за пределы измерения прибора производили разведение экстракта четыреххлористым углеродом.

Концентрацию нефти (нефтепродуктов) в пробе водных растворов рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{C \times V_I \times \eta}{V}, \text{ [мг/дм}^3\text{], где}$$

С – концентрация нефти (нефтепродуктов) в элюате, найденная по показаниям прибора или градуировочной зависимости, мг/дм^3;

V_I – объем элюата, дм^3;

V – объем анализируемой водной пробы, дм^3;

η – степень разбавления элюата; если разбавление не проводилось η=1.

Концентрацию (нефти) нефтепродуктов в пробе почвы рассчитывали по формуле:

$$C_н = \frac{D \times (K \times C_{Нк} - C_{Но}) \times V_o}{P}, \text{ [мг/кг}_{\text{почвы}}\text{], где}$$

D – коэффициент пропорциональности, полученный в результате обработки градуировочной зависимости действительной и измеренной концентрации нефти в почве, устанавливается для данного вида почвы;

К – коэффициент разбавления элюата ЧХУ, $см^3/см^3$;

$С_{Нк}$ – концентрация нефти в разбавленном элюате, определенная по градуировочной зависимости, $мг/дм^3$;

$С_{Но}$ – концентрация в элюате неспецифических составляющих почвенного гумуса, а также остаточных нефтепродуктов, которые могут быть в почве, взятой в качестве контрольной, $мг/дм^3$;

Vo - объем исходного четыреххлористого углерода, взятый для экстракции нефти из образца почвы, $дм^3$;

Р – навеска почвы, кг.

2.2.3. Определение фракционного состава остаточной нефти в пробах относительно исходного состава (контрольные системы)

Оценку фракционного состава остаточной нефти проводили методом жидкостно-адсорбционной хроматографии с применением микроколонок, заполненных силикагелем (по 0,7 г Л40/100 мк силикагеля) (Хемапол, Чехия). Применение фракционирования на силикагеле позволяет разделить остаточную нефть на три условные фракции: гексановая – содержит парафино-нафтеновые и ароматические углеводороды; бензольная – полициклические ароматические углеводороды (бензольные смолы); спирто-бензольная – нафтеновые кислоты, спирто-бензольные смолы. Навески проб (по 0,05 г), полученных экстракцией в ходе весового анализа, диспергировали в 1 мл гексана, наносили на микроколонки и оставляли на 20 мин. Элюцию углеводородов осуществляли гексаном (гексановые фракции), бензолом (бензольные фракции) и смесью бензол-этанол (спиртобензольные фракции) в соотношении (1:1 об./об.) 4-мя порциями по 1 мл в тарированные пробирки. Полученные "гексановые", "бензольные" и "спиртобензольные" фракции упаривали на воздухе и досушивали в вентилируемом сушильном шкафу при 75°С 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.

2.3. Световая микроскопия

Исследование чистых культур штаммов-деструкторов при росте на минеральной среде с нефтью проводили с помощью светового микроскопа «Axio Imager A1» (Zeiss, Германия).

2.4. Электронно-микроскопические методы

2.4.1. Приготовление ультратонких срезов

Для лучшего сохранения поверхностных компонентов бактериальных клеток микроорганизмы медленно осаждали на стеклянном фильтре и фиксировали в 2-3% глютаральдегиде в 0,05 М какодилатном буфере (pH 7,0) в течение 3 часов при -4ºС. После двукратной промывки этим же буфером клетки дофиксировали в течение 16 часов забуференным 2% OsO_4. Затем клетки снова отмывали вышеуказанным буфером и заключали в агаровые блоки.

Последующие процедуры – обезвоживание и заливку в эпоксидную смолу Эпон 812 проводили по общей схеме согласно Лафту (Luft, 1961).

Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме LKB-III (Швеция) и окрашивали свинцом по Рейнольдсу (Reynolds, 1963).

2.4.2. Методика выявления полисахаридов рутением красным по Лафту (Luft, 1966).

Клетки фиксировали в растворе глутаральдегида и рутениевого красного (0,5 мл 3,6% раствора глутаральдегида, 0,5 мл 0,5М какодилатного буфера (pH 7,3), 0,5 мл 0,15-0,3% водного раствора рутениевого красного) в течение 1 ч при 4ºС. Затем промывали в 0,15 М какодилатном буфере 3 раза по 3 мин. Дополнительно фиксировали в течение 3 ч при 20ºС в растворе следующего состава: 0,5 мл 5% OsO_4; 0,5 мл 0,2 М какодилатного буфера (pH 7,3); 0,5 мл 0,15-0,3% раствора рутениевого красного. После этого быстро промывали в буферном растворе, обезвоживали в спиртах и заливали в эпоксидную смолу Epon 812.

Ультратонкие срезы просматривали в электронном микроскопе JEM-100B (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

2.5. Статистическая обработка результатов

Обработку результатов осуществляли с помощью встроенного статистического пакета Excel (MS Office 2007).

2.6. Элиминация бактериальных плазмид

Элиминацию плазмид осуществляли путем длительного культивирования в богатой среде ЛБ. Плазмидосодержащие штаммы засевали в пробирки со средой ЛБ (10 мл) (в некоторых случаях с добавлением бромистого этидия (10мкг/мл)) и выращивали в течение суток при температуре 24°С. Полученную суспензию клеток (0,1 мл) пересевали в новые пробирки со средой. Данную процедуру повторяли 10 раз. Затем, после соответствующих разведений, делали высевы на среду ЛБ. Полученные колонии (500) с помощью репликатора переносили на селективные среды. Отбирали

колонии по отсутствию роста на среде Эванса с добавлением в качестве источников углерода и энергии нафталина, или камфары, или декане, или толуоле. Элиминацию плазмид подтверждали с помощью метода, описанного (Sambrook J. et. al., 1989).

2.7. Коньюгационный перенос бактериальных плазмид

Коньюгационный перенос плазмид осуществляли, используя модифицированный метод Данна и Гонзалеса (Dunn and Gunsalus, 1973). Клетки доноров и реципиентов в соотношении 1:2 наносили на чашки с агаризованной средой LB. После инкубации в течение 12 часов клетки отмывали в 0,85% растворе NaCl и высевали коньюгационную смесь после соответствующих разведений на селективные среды. Трансконьюганты, полученные при скрещиваниях, трижды рассевали до отдельных колоний на соответствующей селективной среде. Частоту конъюгационного переноса плазмид рассчитывали как отношение числа трансконъюгантов к числу клеток донора.

2.8. Трансформация клеток *E. coli* плазмидной ДНК

Трансформацию клеток *E. coli* плазмидной ДНК проводили методом теплового шока (Sambrook et al., 1989).

2.9. Определение стабильности признаков утилизации нафталина и салицилата

Для определения стабильности признака утилизации нафталина у микроорганизмов, используемых в почвенных экспериментах, пробу почвы 0.5 г после соответствующих разведений в фосфатном буфере высевали на чашки с агаризованной средой LB. Чашки инкубировали при температуре 24°С в течение суток. Выросшие клоны в количестве 100-200 с помощью репликатора переносили на агаризованые среды или нафталином. Чашки инкубировали при температуре 24°С в течение 4 суток. Кроме того стабильность признаков биодеградации в неселективных условиях определяли после последовательных пересевов клонов в жидкой среде LB. Для этого культуру микроорганизмов выращивали в 5 мл бульона до поздней логарифмической фазы, по 50мкл суспензии последовательно переносили в свежий бульон на протяжении 10 дней. По истечении 3, 7, 10 суток роста из соответствующих разведений делались высевы на чашки с агаризованной средой LB. Методом реплик сто отдельных колоний переносили на селективные чашки с сукцинатом, салицилатом, 2-метилнафталином, нафталином. Стабильность признака определяли как процентное соотношение количества клонов, сохранивших способность к росту на изучаемом субстрате, к общему числу проверенных клонов.

2.10. Выделение тотальной ДНК микроорганизмов.

Бактериальные клетки, выращенные на триптозно-соевой среде в течение 16 ч, осаждали центрифугированием из 1 мл культуральной жидкости (12000 g, 2 мин). Клетки отмывали в 1 мл 1М NaCl и 50 мМ ЭДТА и повторно центрифугировали (12000 g, 2 мин). Осадок клеток ресуспендировали в 500 мкл раствора содержащего: ЭДТА - 50 мМ с лизоцимом (5-10 млг/мл) и лаурилсаркозин – 1%. Пробирки прогревали в термостате при 37ºС в течение 30 мин. К лизату добавляли 200 мкл фенола и 200 мкл хлороформа, затем центрифугировали (12000 g, 5 мин). Отбирали 500 мкл супернатанта в другую микропробирку, добавляли 200 мкл фенола и 200 мкл хлороформа и центрифугировали (12000 g, 5 мин). Отбирали 500 мкл супернатанта в другую микропробирку, добавляли 400 мкл хлороформа и центрифугировали (12000 g, 5 мин). Отбирали 400 мкл супернатанта в другую микропробирку, добавляли 450 мкл изопропанола и 50 мкл ацетата калия, перемешивали и центрифугировали в течение (12000 g, 5 мин). Осадок промывали 200 мкл 70%-ного спирта и ресуспендировали в 100 - 200 мкл буфера ТЕ (трис-ЭДТА) (pH 8,0) и помещали в термостат на 15 мин при 65ºС.

2.11. Выделение плазмидной ДНК

Плазмидную ДНК выделяли ранее описанным методом (Birnboim and Doly, 1979) с некоторыми модификациями. Ночную культуру (200-250 мл) центрифугировали 15 минут для осаждения биомассы (7000 g). Супернатант сливали, осадок ресуспендировали в 4 мл раствора (Трис-HCl 25 мМ (pH 8,0), Na-ЭДТА 10 мМ (pH 8,0), глюкоза 0,5 мМ, лизоцим 1мг/мл), выдерживали во льду 30 минут. Затем, осторожно перемешивая, добавляли 8 мл раствора (NaOH 0,2 М, SDS 1%), выдерживали 10-15 минут при комнатной температуре для лизиса клеток. Добавляли 6 мл 3 М ацетата натрия и выдерживали во льду 10-15 минут. После этого смесь центрифугировали 20 минут (4500 об/мин), к супернатанту добавляли 14 мл изопропанола, оставляли во льду на 10 минут, центрифугировали 25-30 минут, осадок растворяли в 600-700 мкл ТЕ (трис-ЭДТА, pH=8.0). Для дальнейшей очистки выделенную ДНК переносили в микроцентрифужную пробирку, добавляли 200-250 мкл 10М LiCl, оставляли во льду на 30 минут, центрифугировали 10 минут (12000 g). Супернатант отделяли, добавляли к нему 500-600 мкл изопропанола, оставляли во льду на 10-15 минут, центрифугировали (12000 g) на микроцентрифуге 5-10 минут. Полученный осадок плазмидной ДНК промывали 2 раза 70% этанолом, подсушивали

и растворяли в 100 мкл ТЕ. Выделение крупных плазмид осуществляли методом Экхарда (Sambrook et al., 1989).

2.12. Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции

В работе использовали буферные растворы и эндонуклеазы рестрикции фирмы «Fermentas» (Литва). Общий объем реакционной смеси составлял 20 мкл. Для гидролиза 100-300 нг плазмидной ДНК в реакционную смесь вносили 20-30 единиц соответствующего фермента. Реакцию проводили по протоколу фирмы-производителя при 37ºС в течение 1 часа. Реакцию останавливали прогреванием при 65ºС в течение 15 мин.

2.13. Полимеразная цепная реакция

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли в амплификаторе GeneAmp PCR System 2400 (“Perkin-Elmer”, США) согласно протоколу фирмы производителя (Dombek P.E. et.al., 2000). Реакцию проводили в объеме 25 или 50 мкл в стандартных условиях. Смесь для ПЦР содержала: буфер для фермента (10 мМ Трис-Cl (pH=8.4), 50 мкМ KCl, 0.1 мкг/мкл желатина), 5-10 нг ДНК-мишени, 18пМ каждого праймера, дезоксирибонуклеотид-трифосфаты в конечной концентрации 200 мкМ, 1.5 мМ или 2 мМ MgCl2 (для амплификации гена *nahAc*) и 1.5 – 2.5 единицы ДНК полимеразы Taq фирмы («Promega», США). Нуклеотидная последовательность, температура отжига праймеров и размер ПЦР продуктов сведены в таблице 7.

Для амплификации гена 16S рРНК использовали праймеры 8-f и 1492-r (Weisburg W.G. et.al., 1991). Для амплификации гена большой субъединицы толуол диоксигеназы (todC1) использовали праймеры TODC1-f и TODC1-r. Для амплификации гена катехол-2,3-диоксигеназа (c23o) применяли праймеры c23o-f и c23o-r. В работе также использовали праймеры repF и repR для обнаружения P-9 репликонов (Greated A. et.al., 2002). Для амплификации гена 3-метилкатехол-2,3-диоксигеназа (todE) применяли праймеры c23o-f и c23o-r.

Для амплификации гена большой субъединицы нафталин диоксигеназы *(nahAc)* использовали праймеры Acl49f (5’-CCC YGG CGA CTA TGT-3’) и Ac1014r (5’-CTC RGG CAT GTC TTT TTC-3’) (Ferrero et al., 2002). ДНК денатурировали при 95ºС в течение 5 мин, затем осуществляли 35 циклов в следующем режиме: 94ºС 30 сек, 43ºС 20 сек, 72ºС 1 мин, достройку проводили при 72ºС в течение 4 мин. Электрофорез проводили в горизонтальном агарозном геле по стандартной методике (Sambrook et al., 1989).

Табл. 7. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе.

Ген	Праймеры	Нуклеотидная последовательность	Т отжига °С	Размер ПЦР продукта, п.н.
16S рРНК	8-f 1492-r	5`-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3` 5`-TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-3`	52	1484
nahAc	Acl49f Ac1014r	5'-CCC YGG CGA CTA TGT-3' 5'-CTC RGG CAT GTC TTT TTC-3'	43	865
IncP-9 *RepAB*	repF repR	5`-CCA GCG CGG TAC WTG GG-3` 5`-GTC GGC AIC TGC TTG AGC TT-3`	54	480
todC1	TODC1-f TODC1-r	5`-AATCAG ACC GAC ACA TCA CC-3` 5`-TCC AGT TAC AGG GAA TGA CC-3`	66	625
c23o	C23O -f C23O -r	5`-ATG GAT(A/T/G)T(A/T/G) ATG GG(A/T/G)TTCAAGGT-3` 5`-AC(A/T/G)GTCA(A/T/G)GAA(A/T/G)CG(A/T/G)TCGTTGAG-3`	52-54	721
*tod*E	TODE-f TODE-r	5`-GGA TTT CAA ACT GGA GAC CGA-3` 5`-GCA ATT AGC TTG CAG CAT GAA-3`	58	246
*nah*Y	nahY1-f nahY1-r	5`-CTT GAG TAG AGG TCT GGG TG-3` 5`-CGG TCG CAA TGA GGT T-3`	52	557

rep-PCR (геномный фингерпринт) проводили с использованием праймера BOXA1R (5`-CTACggCAAggCgACgCTgACg-3`). Реакцию проводили в объеме 25 мкл в стандартных условиях. Смесь для ПЦР содержала: буфер Гитчера (83мМ сульфат аммония, 335 мМ Трис-Cl (pH 8,8), 33,5 мМ $MgCl_2$, 33,5 мкМ ЭДТА, 150 мМ β-меркаптоэтанол), 0,16 мкг/мл БСА (бычий сывороточный альбумин), 100 нг ДНК-мишени, 50 пМ праймера, дезоксирибонуклеотид-трифосфаты в конечной концентрации 1200 мкМ, 5% диметилсульфоксид (ДМСО) и 2,5 единицы ДНК полимеразы *Taq* («Promega», США).

ПЦР – реакция начиналась с инкубации при 95°С в течение 5 минут. Реакция составляла 30 циклов. Один цикл включал следующие стадии: 1 мин при 94°С, 1 мин при 50°С, 8 мин при 65°С. Завершающая стадия ПЦР – реакции 8 мин при 65°С. Затем реакционную смесь оставляли при 4°С.

2.14. RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) анализ.

ПЦР – реакцию для RAPD анализа проводили в ДНК-амплификаторе GeneAmp PCR System 2400 («Perkin-Elmer», США) с использованием праймеров OA20 (GTTGCGATCC), OG06 (GTGCCTAACC), OS09 (TCCTGGTCCC) и OS14 (AAAGGGGTCC) по следующей программе (Tiago et al., 2004): 40 циклов: 94ºС – 1 мин, 45ºС – 1мин, 72ºС – 2мин; 72ºС – 7 мин. Реакционная смесь (25 мкл) содержала буфер Гитчера, ДМСО – 1%, праймер – 0,3 мкг, Taq ДНК-полимераза («Promega», США) – 0,4 ед, дНТФ – 1,25 мМ, БСА – 0,4 мг, ДНК – 25-100 нг.

2.15. Разделение амплифицированных фрагментов ДНК.

Амплифицированную ДНК (10 мкл) разделяли в 2%-ной агарозе при напряжении поля 1 В/см. В качестве буфера использовали трис-боратный буфер (трисоксиметиламинометан - 5,4 г/л, борная кислота - 2,75 г/л, ЭДТА - 0,46 г/л, pH 8,0) (Sambrook et al., 1989). Агарозные гели окрашивали раствором бромистого этидия (1-2 мкг/мл) в течение 15-20 минут и фотографировали в ультрафиолетовом свете с помощью системы Kodak EDAS 9000.

2.16. Электрофорез в агарозном геле

Электрофорез проводили в горизонтальном агарозном геле (Маниатис и др., 1984). Для этого использовали агарозу в концентрации 0.8% и 0.5×Трис-боратный буфер (89 мМ H_3BO_3, 89 мМ Трис-Cl, 0.002 М ЭДТА). Визуализацию ДНК проводили путем окрашивания геля в растворе бромистого этидия или же бромистый этидий добавляли в анарозу в конечной концентрации 0.5 мкг/мл. Для нанесения проб использовали буфер следующего состава: 0.025% ксилолцианол, 0.025% бромфеноловый синий, 2.5% фикол (тип 400). В качестве маркера использовали стандарт 1 kb DNA Ladder фирмы “Gibco BRL” (США). Гель фотографировали, используя Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290.

2.17. Определение активностей ключевых ферментов биодеградации нафталина

Определение активностей ферментов проводили в бесклеточных экстрактах. Культуры выращивали на минимальной среде с нафталином или салицилатом в качестве источника углерода. Клетки осаждали центрифугированием (5000 g, 0˚ С, 10мин), дважды отмывали 0,05 М калий-фосфатным буфером (pH 7.0). Отмытые клетки ресуспендировали в 4 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера, замораживали и разрушали на ИБФМ-прессе (Россия) (7 атм). После дезинтеграции клеточный дебрис и неразрушенные клетки удаляли центрифугированием (32 000 g, 0˚ С, 60 мин). Супернатант немедленно использовали в качестве клеточного экстракта для

определения активностей ферментов. В реакционную смесь с конечным объемом 3 мл вносили 100-200 мкл экстракта. Определение активностей проводили при 20˚С, начиная реакцию внесением клеточного экстракта, на UV-160A спектрофотометре (Shimadzu, Япония).

Активность нафталиндиоксигеназы определяли спектрофотометрически по уменьшению экстинкции NADH реакционной смеси, содержащей 100 мкМ NADH и 100 мкМ нафталин (спиртовой раствор), бесклеточный экстракт и 0,05 М фосфатный буфер pH 7,5, учитывая эндогенное потребление NADH бесклеточным экстрактом (λ=340 нм, ε=6,220 $мМ^{-1}$ $см^{-1}$) (Dua, Meera, 1981).

Активность салицилатгидроксилазы определяли спектрофотометрически по уменьшению экстинкции NADH реакционной смеси, содержащий 100 мкМ NADH и 100 мкМ салицилат, бесклеточный экстракт и 0,05 М фосфатный буфер pH 7,5, учитывая эндогенное потребление NADH бесклеточным экстрактом (λ=340 нм, ε=6,220 $мМ^{-1}$ $см^{-1}$) (Kiyohara et al., 1978).

Активность катехол-2,3-диоксигеназы определяли по скорости образования α-оксимуконового полуальдегида в реакционной смеси, содержащей 0.5 мМ катехола, бесклеточный экстракт и 0,05 М Трис-HCl буфер (pH 7.5) (λ =375 нм, ε=33,4 $мМ^{-1}$ $см^{-1}$) (Feist, Hegeman, 1969).

Активность катехол-1,2-диоксигеназы определяли по скорости образования *цис-цис*-муконата в реакционной смеси, содержащей 5 мМ Na-ЭДТА, 1 мМ катехола, бесклеточный экстракт, 0,05 М фосфатный буфер (pH 7,0) (λ =260 нм, ε=16,9 $мМ^{-1}$ $см^{-1}$) (Ornston, 1966).

Удельную активность ферментов выражали в микромолях потребленного субстрата (кофактора) (или образующегося продукта [кофактора] в минуту на 1 мг общего бактериального белка. Значения удельных активностей ферментов рассчитывали, используя компьютерную программу "Enzyme" (ИБФМ, Россия).

2.18. Определение концентрации белка

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд (Bredford, 1976).

2.19. Измерение индекса эмульгирования

Индекс эмульгирования определяли по методике, описанной в работе Купера и Голденберга (Cooper and Goldenberg, 1987). Пробу, объёмом 4 мл помещали в мерную пробирку. Добавляли 4 мл гексадекана. Пробирку плотно закрывали и интенсивно перемешивали в течение двух минут. Оставляли пробирки при комнатной

температуре. Индекс эмульгирования определяли через 24 часа (E_{24}) и рассчитывали как процентное отношение объёма слоя плотной эмульсии («сливок») к общему объёму жидкости в пробирке.

Определение индекса эмульгирования суспензий клеток, проводили следующим образом. Изучаемые микроорганизмы выращивали на агаризованных средах в течение трёх суток. Полученную свежевыращенную биомассу смывали физиологическим раствором, а затем дважды отмывали. После удаления супернатанта осадок клеток ресуспендировали в физиологическом растворе до концентрации 10^8 КОЕ/мл. Полученную клеточную суспензию использовали для определения индекса эмульгирования.

2.20. Измерение эмульгирующей активности

Эмульгирующую активность микроорганизмов измеряли визуально, согласно методике, предложенной Франси с соавт. (Francy et al., 1991). Сразу после окончания культивирования хорошо перемешанным культуральным средам присваиваются баллы по четырёхбалльной шкале в зависимости от их мутности (4 – максимальное эмульгирование, 0 – отсутствие эмульгирования). Для определения эмульгирующей активности бесклеточного супернатанта использовали методику, предложенную Цириглиано и Карменом (Cirigliano and Carman, 1984). Клетки удаляли центрифугированием в течение 5 мин. при 10000 об./мин. на микроцентрифуге MiniSpin («Eppendorf», ФРГ), при комнатной температуре. К 1,5 мл полученной пробы бесклеточного супернатанта добавляли 1,5 мл 0,05 М натрий-калиевого фосфатного буфера (pH 6,8) и 0,75 мл гексадекана. Полученную смесь интенсивно перемешивали в течение двух минут и сразу проводили измерение оптической плотности при длине волны 540 нм на спектрофотометре Cintra 6 UV-Visible («GBC Scientific Equipment», Австралия), длина кюветы 1 см. Раствор сравнения готовили аналогично, заменяя супернатант фосфатным буфером.

2.21. Измерение поверхностного натяжения

Измерение поверхностного натяжения проводили на тензиометре Surface Tensiomat («Cole-Parmer», США) при температуре 25°С. Поверхностное натяжение раствора сравнения (среда Эванса) составляло 77 дин/см.

2.22. Измерение содержания гликолипидных биоПАВ

Содержание биосурфактанта оценивали фотоколориметрически по концентрации сахара (Dubois et al., 1956), являющегося частью гликолипида.

Из культуральной жидкости предварительно удаляли клетки центрифугированием в течение 10 мин. при 10000 об./мин. на центрифуге Rotanta 460R («Hettich-Zentrifugen», ФРГ) при температуре 4°С. Пробу супернатанта объёмом 2 мл помещали в пробирку, добавляли 20 мкл 80% раствора фенола в воде. При интенсивном перемешивании вносили 5 мл концентрированной серной кислоты (ρ=1,84 г/мл). Оставляли на 10 мин. Затем опять интенсивно перемешивали и на 20 мин. помещали на водяную баню при 25°С. Измерение оптической плотности полученного раствора проводили на спектрофотометре Cintra 6 UV-Visible («GBC Scientific Equipment», Австралия), длина кюветы 1 см. Длину волны измерения выбирали оптимальную для данного углевода в области 480-490 нм по максимуму поглощения. Раствор сравнения готовили аналогично, заменяя пробу дистиллированной водой. Содержание сахара находили по предварительно построенным градуировочным зависимостям для соответствующего углевода. Для расчета содержания биосурфактанта полученное значение концентрации сахара умножали на коэффициент, равный отношению молекулярной массы биосурфактанта на молекулярную массу соответствующего углевода (табл. 8).

Табл. 8. Коэффициенты пересчёта массы углевода на массу гликолипида.

Штамм	Молекулярная масса углевода	Молекулярная масса гликолипида	Коэффициент
P. fluorescens 142NF	164 (рамноза)	802	4,9
P. putida BS3701			
Rhodococcus sp. S67	342 (трегалоза)	862	2,5
Rhodococcus sp. X5			
Rhodococcus sp. S26			

2.23. Очистка биоПАВ методом колоночной хроматографии

Клетки удаляли центрифугированием в течение 30 мин. при 5000 об./мин. на центрифуге К26 («Janetzki», Польша) при 4°С. Полученный бесклеточный супернатант подкисляли концентрированной соляной кислотой до pH 2. Раствор оставляли на ночь при 4°С. Экстракцию проводили смесью хлороформ:метанол (3:1 по объёму) из равного объёма пробы. Нижний органический слой собирали, растворитель удаляли на роторном испарителе.

Очистку биоПАВ, входящих в состав экстракта, проводили на стеклянной хроматографической колонке 20 × 1 см. В качестве сорбента использовали силикагель L 40/100 («Chemapol», Чехословакия).

Элюирование образцов, содержащих трегалолипиды родококков, проводили вначале хлороформом, затем смесью хлороформ:метанол (10:2 об.); содержащих рамнолипиды псевдомонад – смесью хлороформ:метанол (10:1 об.), затем смесью хлороформ:метанол (10:4 об.). Гликолипиды в элюируемых фракциях обнаруживали методом тонкослойной хроматографии.

2.24. Тонкослойная хроматография гликолипидов

Для обнаружения соединений гликолипидной природы в пробах пользовались ТСХ. Разделение проводили на пластинах Kieselgel 60 («Merck», ФРГ) элюируя смесями хлороформ:метанол:вода (65:15:2 об. для трегалолипидов родококков; 65:25:4 об. для рамнолипидов псевдомонад). Для обнаружения гликолипидов пластинки обрабатывали нафтольным реагентом (0,5 г α-нафтола в 100 мл смеси метанол-вода 1:1), затем 10% серной кислотой и нагревали при 110°С до максимального проявления окраски (Кирхнер, 1981). Гликолипиды проявлялись сине-фиолетовыми пятнами.

Для обнаружения аминогрупп пластинку обрабатывали свежеприготовленным 0,25% раствором нингидрина в ацетоне, нагревали в течение 5 минут при 110°С (Кирхнер, 1981).

2.25. Анализ биоПАВ методом масс-спектрометрии

Масс-спектрометрические измерения проводились на приборе с ионной ловушкой LCQ Deca XP («ThermoFinnigan», США). Ионизацию образцов проводили методом электрораспыления.

2.26. Анализ биоПАВ методом инфракрасной спектроскопии

Регистрацию ИК-спектров проводили на Фурье-спектрометре ФСМ 1201 (ООО «Инфраспек», Санкт-Петербург).

2.27. Условия проведения периодического культивирования в ферментёре

Культивирование проводили в ферментёре АНКУМ-2М (ИБП РАН, г. Пущино, Россия) объёмом 10 л с коэффициентом заполнения 0,6. Ферментёр был оснащён механической мешалкой, фильтрами тонкой очистки воздуха, датчиками температуры, кислотности среды, скорости перемешивания и расхода воздуха на аэрацию.

Посевную культуру для всех ферментаций выращивали на среде Эванса с нафталином (для *P. fluorescens* 142NF) или дизельным топливом (ДТ) (для *Rhodococcus* sp. S67) в течение 24 часов.

Для культивирования микроорганизма *P. fluorescens* 142NF была выбрана полусинтетическая среда следующего состава: кислотный гидролизат казеина – 10 г/л; дрожжевой автолизат – 70 мл/л; $(NH_4)_2SO_4$ – 6 г/л; K_2HPO_4 – 2 г/л; глюкоза – 20 г/л; $MgSO_4$ – 0,3 г/л; $MnSO_4$ – 0,05 г/л; пеногаситель «СОФЭКСИЛ-1520» (20% водно-масляная эмульсия полиметилдисилоксана, «Софэкс-Силикон», Россия) – 1 мл/л; водопроводной воды до 6 л. В качестве добавок использовали или салицилат натрия (содержание 0,2 г/л), или дизельное топливо (0,45 мл/л).

Режим культивирования: температура 28°С; число оборотов мешалки 450 об/мин; кислотность среды pH 6,8±0,2 (поддерживалась автоматически, добавлением в среду 12% раствора аммиака); аэрация воздухом 3 л/мин от 0 до 4 часов роста, затем и до конца процесса – 6,0 л/мин.

Условия культивирования микроорганизмов штамма *Rhodococcus* sp. S67 были выбраны сходные с условиями культивирования псевдомонад. Состав среды отличался содержанием кислотного гидролизата казеина – 5 г/л; дрожжевого автолизата – 100 мл/л и наличием пептона – 5 г/л. В середине экспоненциальной фазы роста вносили добавку ДТ (1 мл/л).

Режим культивирования был аналогичен режиму выращивания культуры псевдомонад, за исключением кислотности среды (pH 7,0±0,2) и аэрации (3 л/мин от 0 до 8 часов роста, затем 6,0 л/мин).

Для выращивания смешанной культуры *P. fluorescens* 142NF и *Rhodococcus* sp. S67 были выбраны условия культивирования, аналогичные условиям культивирования родококков. Засев штамма *P. fluorescens* 142NF через 12 часов после начала процесса, одновременно добавляли 6 г/л глюкозы.

Получение концентрированной суспензии микроорганизмов производили путём центрифугирования в течение 30 мин. на центрифуге К70 («Janetzki», Польша) при скорости 5000 об/мин. при 4°С.

2.28. Хранение микроорганизмов

Хранение полученной биомассы осуществляли следующими способами: при 2-4°С концентрированную суспензию хранили в жидком виде без добавления консервантов в качестве контроля, в разбавленном 0,05 М натрий-калиевым фосфатным буфером pH=7,0 виде (1:1 по массе), а так же с использованием различных консервирующих растворов: с 20% раствором сахарозы, 0,2% раствором бензоата натрия и 0,2% раствором глутамата натрия (отношение биомасса:раствор составляло 1:1 по массе).

В замороженном виде биомассу хранили при –20°С с добавлением 20% раствора сахарозы в качестве криопротектора (1:1 по массе).

2.29. Лиофилизация

Перед лиофилизацией концентрированную суспензию, смешанную с защитной средой выдерживали при температуре –20°С 24 часа. В качестве защитных сред использовали: раствор №1: 4% тиомочевины, 8% сахарозы, 4% полиглюкина; раствор №2: 6% тиомочевины, 10% сахарозы; раствор №3: 20% сахарозы. Соотношение биомасса:защитная среда составляло 1:1 по массе. Лиофилизацию проводили на установке для лиофильной сушки КС30 («Frigera», Чехия), при температуре 35°С и давлении 4 мкм рт. ст. (0,5 Па). Полученный сухой препарат хранили при комнатной температуре в герметичных стеклянных флаконах.

2.30. Контактная сушка

Готовили защитную среду на основе 0,05 М натрий-калиевого фосфатного буфера (pH 6,8), содержащую 4% полиглюкина, 10% сахарозы, 4% тиомочевины, 2% аскорбиновой кислоты. Кислотность среды доводили до значения pH 6,8–7,2 титрованием 45% раствором гидроксида натрия. Концентрированную суспензию микроорганизмов смешивали с защитной средой в пропорции 1:1 по массе. Затем смесь медленно добавляли в емкость, содержащую сорбент (песок перлитовый, ГОСТ 10832-91), обеспечивая равномерное распределение раствора по объему сорбента интенсивным перемешиванием. Количество сорбента определяли исходя из соотношения: на 1 г смеси концентрированной суспензии с защитной средой необходимо 0,25 г сорбента. Образец наносили тонким слоем на ровную, гладкую, стерильную поверхность, не допускающую прилипания (стеклянная пластина). Препарат высушивали при 37°С в течение 24-48 часов до постоянной массы.

Полученный сухой препарат герметично упаковывали в полиэтиленове пакеты и хранили при комнатной температуре, в холодильнике при температуре 2-4°С и в морозильной камере при -20°С.

2.31. Приготовление модельных почвенных систем

Для приготовления модельных почвенных систем использовали лугово-аллювиальную почву, взятую у р. Ока вблизи г. Пущино Московской области, следующего состава: 2,75% углерода; 4,74% гумуса; 225 мг общего азота на 100 г почвы; 500 мг P_2O_5 на 100 г почвы; 16,88 мг K_2O на 100 г почвы; pH водной вытяжки 8,16. Перед использованием почву просеивали через сито с диаметром отверстий 2,0 мм диаметра. Для приготовления стерильных модельных систем почву трижды

стерилизовали (1 атм. 30 мин при 121°С) с интервалом в 1 сутки. Затем навеску почвы массой 0,5 кг тщательно перемешивали с нефтью. Приготовленную таким образом почву с нефтью помещали в пластиковые контейнеры (толщина слоя почвы 10 см). Модельные почвенные системы инкубировали при температуре 18-25°С.

2.32.Внесение инокулята в почву в лабораторных модельных системах

Бактерии выращивали в жидкой среде ЛБ до конца экспоненциальной фазы роста (1×10^9 кл/мл среды), затем добавляли 1мл/л дизельного топлива (для активации ферментных систем) и растили культуру еще 1,5-2 часа. Затем, используя стандарт мутности, суспензию бактерий разводили фосфатным буфером до концентрации $1\text{-}5\times10^8$ кл/мл. Приготовленную таким образом бактериальную суспензию добавляли в фосфатный буфер, и затем воду с инокулятом вносили в почву. Вносимое количество воды рассчитывали исходя из влажности 25%. Количество вносимой бактериальной суспензии рассчитывали так, чтобы конечная концентрация составляла 3×10^6 микроорганизмов на 1 г сухой почвы. В качестве биогенных источников азота, фосфора и калия использовали минеральное удобрение «Нитроаммофоска» (ООО «Фаско+», Россия), которое вносили в количестве 1,5 г на 1 кг почвы. Затем почву в горшках тщательно гомогенизировали шпателем. Ежедневно проводилось рыхление почвы стерильным шпателем, измерение температуры и добавление воды до поддержания влажности на уровне 25%.

Повторные инокуляции проводили через две недели.

2.33. Отбор проб для определения общей численности микроорганизмов и содержания нефти

Для определения общей численности микроорганизмов и содержания нефти отбирали усредненные пробы (1 г и 5 г, соответственно) из 3-4 разных участков почвы каждые 2 недели. Пробы весом 1 г ресуспендировали в 9 мл фосфатного буфера и перемешивали на миксере “Paramix 2” (ФРГ) в течение 1 минуты при комнатной температуре и после соответствующих стандартных разведений высевали на чашки с ЛБ-агаром. Чашки инкубировали при 24°С в течение суток. Число колониеобразующих единиц рассчитывали на 1 г сухой почвы.

2.34. Определение концентрации нафталина в почвенных экстрактах

Нафталин экстрагировали из почвенных пробы массой 0,5 г метанолом (20 мл). Для определения содержания нафталина в почве использовались жидкостной метод хроматографии высокого давления. Метанольный экстракт почвенных образцов, предварительно освобожденный от механических примесей центрифугированием,

наносили на хроматографическую колонку и проводили анализ в нижеследующих условиях: объем образца 25-100 мкл; колонка – Pharmacia LKB Biotechnology Column, 4 мм × 250 мм; носитель – Spherisorb ODS2, 5мкм; скорость протока – 0.7 мл/мин; длина волны детектирования – 275 нм; элюент – 75% метанол. Анализ проводили на ВЭЖХ хроматографе LKB-2150 (Швеция). Время удерживания (Rt) пика нафталина составило 11.2 мин.

2.35. Определение концентрации салицилата в культуральной жидкости

Взвесь из бактериальных клеток, выращенных в среде Эванса с нафталином, и продуктов метаболизма осаждали из культуральной жидкости центрифугированием на микроцентрифуге «Eppendorf miniSpin» («Eppendorf AG», Германия) при 14000 об/мин в течение 4 мин. Супернатант в количестве 200 мкл анализировали с использованием ВЭЖХ хроматографа LKB-2150; колонка - Pharmacia LKB Biotechnology Column; носитель – Spherisorb ODS2 C18, 5um, 4mm×250 mm; скорость протока – 1 мл/мин; длина волны детектирования – 310 нм; элюент – 75% метанол. Расчет концентрации салицилата производили по площади пика по сравнению с площадью пика контрольного образца.

2.36. Мониторинг штаммов-деструкторов в процессе деградации нефти в модельных почвенных системах

Для различия микроорганизмов, входящих в состав интродуцированной микробной ассоциации, от аборигенных деструкторов нефти проводили мониторинг данных штаммов, основанный на культурально-морфологических признаках, маркерах антибиотикорезистентности и флюоресценции под ультрафиолетом. После соответствующих разведений почвенных проб в фосфатном буфере делали высевы на агаризованные среды ЛБ с антибиотиками, минеральную среду Эванса с нефтью и/или дизельным топливом (для штаммов PCL1391, PCL1391(pBS216), PCL1391(pOV17), BS3701(pNF1141, pNF1142) и BS3701E(pNF1142)) и нафталином (для штаммов PCL1391(pBS216), PCL1391(pOV17) и BS3701(pNF1141, pNF1142)).

Для отличия микроорганизмов, интродуцированных в почву, от аборигенных деструкторов нефти использовали агаризованную среду ЛБ со следующими антибиотиками в конечной концентрации (мкг/мл среды): цефазолин 100 и новобиоцин 100, к которым были устойчивы интродуцированные штаммы (PCL1391, PCL1391(pBS216), PCL1391(pOV17), BS3701(pNF1141, pNF1142) и BS3701E(pNF1142)); а для штаммов 1б и F701– тетрациклин 10, для S26 –

стрептомицин 100, для 7 – триметаприм 100. Дополнительным маркером для штаммов BS3701, F701 и BS3701E было ярко-зелёное свечение колоний в ультрафиолетовом свете (λ=254 нм) при росте на агаризованной среде КБ.

Использование ПЦР с праймерами Acl49f и Ac1014r (Ferrero et al., 2002) позволило следить за геном нафталин диоксигеназы *nahAc*.

Для мониторинга штаммов родококков, входящих в состав микробных ассоциаций, в смешанных микробных популяциях и после их интродукции в окружающую среду применяли RAPD анализ с использованием праймера OA20 (GTTGCGATCC).

2.37. 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. Толщина экспериментального слоя составляла 10-15 см. Перед началом эксперимента почву перекапывали и тщательно перемешивали с внесённым песком (20 кг на один участок). Песок добавляли для улучшения структуры почвы и равномерного распределения в ней нефти. Бактериальную суспензию и удобрение вносили, как описано в пункте «Внесение инокулята в почву в лабораторных модельных системах». Для оценки степени восстановления почвы использовали овёс в качестве биоиндикатора.

2.38. Полевые испытания опытного образца биопрепарата «МикроБак»

Полевые испытания опытного образца биопрепарата «МикроБак» проводили на территории ОАО «Тульская Топливно-Энергетическая Компания» в период с сентября по ноябрь 2007 года. Уровень начального загрязнения грунта составлял до 14 г нефтепродуктов на 1 кг грунта. Для приготовления рабочего раствора 300 мл концентрированной суспензии биопрепарата (с численностью $2,5 \times 10^{10}$ КОЕ/мл) вносили при перемешивании в ёмкость, содержащую 5 л воды. Одновременно с интродукцией биопрепарата вносили минеральное удобрение (Нитроаммофоска). Через 14 суток осуществляли повторное внесение биопрепарата и удобрения, которое сопровождалось рыхлением грунта на глубину 10-20 см.

2.39. Гнотобиотическая система для выращивания растений

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, фирма “Sigma”) в 150 г песка при влажности 15%. Нефть вносили в концентрации 2%. Для обеспечения минерального питания растений использовалась среда "Murashige and skoog basal salt” (“Sigma”).

Семена стерилизовали 10% раствором гипохлорита натрия в течение 30 мин., затем промывали 4 раза стерильной водопроводной водой в течение 2 часов. Семена раскладывали на Л-агар и инкубировали 18-20 ч. при 24°С, для контроля стерильности семян.

Для экспериментов с нефтью микроорганизмы вносили непосредственно в песок (почву) в концентрации 1.5×10^8 КОЕ/г песка (почвы), а затем помещали в сосуды стерильные проростки растений. Растения выращивали со следующим режимом: 12-часовой световой период и 12-часовой темновой период при температуре 20°С.

2.40. Полевые испытания растительно-микробной ассоциации «ВиО» — ячмень

Полевые испытания проводились на территории Ямало-ненецкого автономного округа, на участках Холмогорского нефтяного месторождения в период июнь — август 2008 г. В течение эксперимента средняя температура воздуха составляла 11°С, а средняя температура песка на глубине 10 см — 10°С. Значение pH почвы было равно 4.5. Уровень начального загрязнения грунта нефтью — до 110 г/кг почвы. Площадь загрязненного участка — 0.249 га. Ассоциацию вносили до конечной концентрации 10^5 КОЕ/г. Вносили мочевину в концентрации 150 г/га, проводили рыхление почвы и увлажнение.

Для контроля за численностью микроорганизмов и содержанием нефти отбирали пробы через 1 и 2 месяца после внесения биопрепаратов.

Для определения степени восстановления и эффективности биоремедиации почвы, загрязненной нефтью, в качестве биоиндикаторв использовали смесь ячменя и многолетних трав.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Изучение и характеристика активных микроорганизмов-деструкторов углеводороды нефти

В процессе работы были изучены более 220 штаммов-деструкторов углеводородов нефти из коллекции лаборатории биологии плазмид ИБФМ им. Г. К. Скрябина РАН на способность утилизировать дизельное топливо или нефть в качестве единственного источника углерода и энергии в широком температурном диапазоне (4–42°C).

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

3.1.1.1. Характеристика штаммов-деструкторов углеводородов нефти

Для исследуемых микроорганизмов был определён температурный диапазон, способность к продукции биоэмульгаторов, галотолерантность, спектр утилизируемых субстратов, антибиотикорезистентность и диапазон pH. Выбор наиболее активных штаммов-деструкторов был проведён по следующим критериям: способность к росту на дизельном топливе и/или нефти как при температурах 24-32°C, так и при низких положительных температурах (4°C), в присутствии NaCl. На основании полученных результатов были отобраны 9 психротрофных микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти, которые на основании определения первичной нуклеотидной последовательности генов 16S рРНК были идентифицированы как *Rhodococcus* sp. S25, *Rhodococcus* sp. S26, *Rhodococcus* sp. S67, *Rhodococcus* sp. X5, *Rhodococcus* sp. X25, *Rhodococcus equi* Ars38, *Microbacrerium* sp. Ars25, *Pseudomonas* sp. 142NF(pNF142), *Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142). Физиолого-биохимические характеристики вышеописанных штаммов представлены в таблицах 9, 10, 11, 12, 13.

Микроорганизмы-деструкторы различались по способности к росту на дизельном топливе, нефти, мазуте, гексадекане, бензоате, бензоле, толуоле или нафталине в качестве единственного источника углерода и энергии в диапазоне температур от 4 до 32°C.

Изучение способности микроорганизмов к росту на нефти и дизельном топливе в присутствии 3, 5, 7 или 10% NaCl при 24 и 4°C показало, что все бактерии способны к росту в жидкой минеральной среде в присутствии 3% NaCl, два из них – *Rhodococcus* sp. X5, *Pseudomonas* sp. 142NF(pNF142) – при 5%, и только один штамм – *Rhodococcus* sp. X5 – при 7 и 10% (Табл. 11).

Все штаммы способны к росту в диапазоне pH 5-8.

Табл. 9. Способность к росту на различных субстратах и средах исследуемых штаммов при 24 ℃ и 4 ℃

Штамм	Рост на различных агаризованных средах (субстратах)																																Тип клеточной стенки*
	Диз. Топливо (4°C)	Диз. Топливо (24°C)	Нефть (4°C)	Нефть (24°C)	Мазут (4°C)	Мазут (24°C)	Нафталин (4°C)	Нафталин (24°C)	Салицилат (4°C)	Салицилат (24°C)	Толуол (4°C)	Толуол (24°C)	Капролактан (4°C)	Капролактан (24°C)	Гексадекан (4°C)	Гексадекан (24°C)	Гентизан (4°C)	Гентизан (24°C)	Орто-фталат (4°C)	Орто-фталат (24°C)	Бифенил (4°C)	Бифенил (24°C)	Бензоат (4°C)	Бензоат (24°C)	LB-агар (4°C)	LB-агар (24°C)	TSA (4°C)	TSA (24°C)	PIA (4°C)	PIA (24°C)	KB (4°C)	KB (24°C)	
Rhodococcus sp. S25	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-								+	+
Rhodococcus sp. S26	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhodococcus sp. S67	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhodococcus sp. X5	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhodococcus sp. X25	+	+	+	+	-	+	+								+	+								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhodococcus equi Ars38	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Microbacterium sp. Ars25	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pseudomonas sp. 142NF(pNF142)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Pseudomonas putida BS3701 (pBS1141, pBS1 142)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

* тип клеточной стенки:
+ грамположительные
- грамотрицательные

*Табл. 10. Антибиотикограмма**

Антибиотик / Штамм	Ампицилин 500	Ампицилин 1000	Тетрациклин 10	Тетрациклин 30	Цефазолин 50	Цефазолин 100	Стрептомицин 50	Стрептомицин 100	Канамицин 20	Канамицин 50	Клафоран 50	Клафоран 100	Рифампицин 50	Рифампицин 100	Бензилпенициллин 50	Бензилпенициллин 100	Гентамицин 10	Гентамицин 20	Триметаприм 50	Триметаприм 100	Неомицин 50	Неомицин 100
Rhodococcus sp. S25							R	R														
Rhodococcus sp. S26							R	R														
Rhodococcus Sp. S67									R	R												
Rhodococcus sp. X5					R	R	R		R		R	R			R	R	R	R			R	
Rhodococcus sp. X25									R													
Rhodococcus equi Ars 38			R	R			R	R	R	R					R							
Microbac terium sp. Ars 25	R	R	R						R													
Pseudomonas sp. 142 NF (pNF142)	R		R		R	R					R	R			R	R						
Pseudomonas putida BS3701 (pBSl 141, pBSl 142)			R		R	R									R	R						

* приводится конечная концентрация антибиотика в ЛБ-агаре (мкг/мл среды); R - устойчивость к данному антибиотику.

Табл. 11 Способность микроорганизмов-деструкторов к росту на нефти и дизельном топливе в присутствии 3, 5, 7 и 10% NaCl при 24 и 4°С

Штамм	Среда Эванса в присутствии различной концентрации соли							
	3%NaCl				5%NaCl		7%NaCl	10%NaCl
	2% дизельного топлива		2% нефти		2% нефти		2% нефти	2% нефти
	при 24°С	при 4°С	при 24°С	при 44°С	при 24°С	при 4°С	при 24°С	при 24°С
Rhodococcus sp. X5	+	+	+	+	+	-	-	-
Rhodococcus sp. X25	+ (хлопья)	+	+	+	-	-	-	-
Rhodococcus sp. S25	+ (хлопья)	+-	+	+-	-	+-	-	-
Rhodococcus sp. S26	+	+-	+	+	-	-	-	-
Rhodococcus sp. S67	+ (хлопья)	+	+	+	-	+-	-	-
Rhodococcus equi Ars38	+	-	+	+	-	-	-	-
Microbacterium sp. Ars25	-	-	+	+	+	-	-	-
Pseudomonas sp. 142 NF(pNF142)	+-	+	+	+	+	-	-	-
Pseudomonas putida BS3701(pBS1141, pBS1142)	+	+	+	+-	-	-	-	-

Условные обозначения: + рост

+- слабый рост

- отсутствие роста

Табл. 12 Эмульгирующая активность при 24°С.

Штамм	Визуально баллы		Оптическая плотность после центрифугирования	
	Без NaCl	3%NaCI	Без NaCl	3%NaCI
Rhodococcus sp. X5	4	4		
Rhodococcus sp. X25	4	4	0,640	0,098
Rhodococcus sp. S25	4	4	0,135	0,036
Rhodococcus sp. S26	4	2	2,280	0,031
Rhodococcus sp. S67	3	3	1,663	0,121
Rhodococcus equi Ars38	3	2	0,101	н/о
Microbacterium sp. Ars25	3	2	0,098	н/о
Pseudomonas sp.142NF(pNF142)	4	2	1,590	0,044
Pseudomonas putida BS3701 (pBS1141, pBS1 142)	4	4	1,033	н/о

Прим. н/о – не определены

Проверку микроорганизмов на способность к продукции биоэмульгаторов проводили при культивировании бактерий в среде с гексадеканом и оценивали по четырёхбальной шкале согласно методике (Francy et al., 1991). Как видно из данных таблицы 4, все исследованные микроорганизмы обладали высокой эмульгирующей активностью. На основании анализа полученных результатов по оптической плотности большинство микроорганизмов-деструкторов было отнесено к экзо-типу, т.е. продуцируемые ими биоэмульгаторы выделяются в культуральную жидкость и поэтому оптическая плотность культуральной жидкости после центрифугирования в присутствии гексадекана была высокой (более 0,1). Штаммы *Microbacterium* sp. Ars25 и *Rhodococcus equi* Ars38 были отнесены к эндо-типу, т.к. биоэмульгаторы связаны с клеточной стенкой микроорганизмов. Как видно из приведенных данных, наличие в среде 3% NaCl приводило к уменьшению эмульгирующей активности, проявляемой микроорганизмами. Кроме того, для более точной оценки эмульгирующей способности штаммов сравнивали значения индекса эмульгирования для каждого микроорганизма. Результаты представлены в таблице 13. Наибольшее значение индексов эмульгирования наблюдали для штаммов X5, S26, 142NF и BS3701.

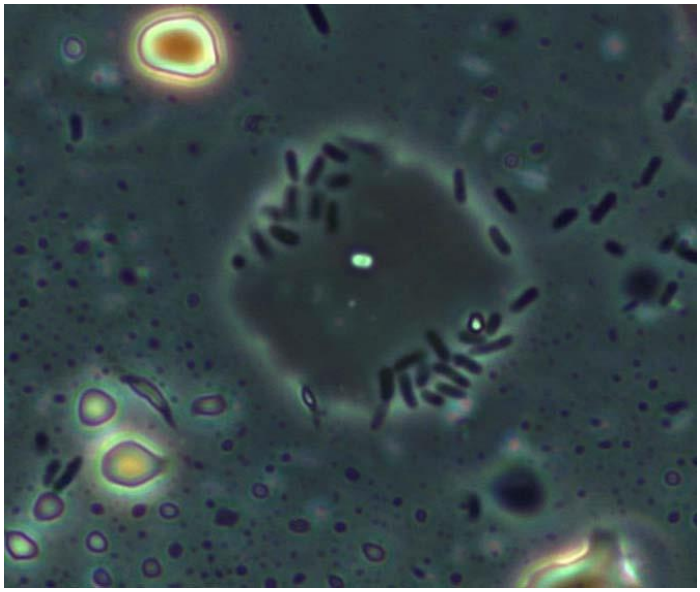
Табл. 13. Индекс эмульгирования

Микроорганизм	**E_{24} %**
Rhodococcus sp. X5	75
Rhodococcus sp. X25	21,3
Rhodococcus sp. S25	8,8
Rhodococcus sp. S26	47,4
Rhodococcus sp. S67	77,5
Rhodococcus equi Ars38	1,3
Microbacterium sp. Ars25	2.,5
Pseudomonas sp. 142NF(pNF142)	50
Pseudomonas putida BS3701 (pBS1141, pBS1 142)	52,5

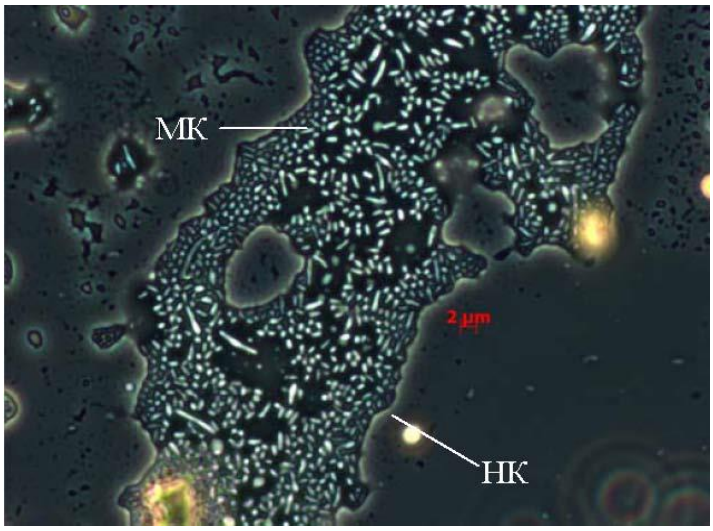
3.1.1.2. Изучение взаимодействия микроорганизмов-деструкторов с нефтью с помощью световой и электронной микроскопии

При исследовании бактериальной суспензии после трёхдневного культивирования в минеральной среде с нефтью с помощью микроскопии было показано, что клетки штамма *Rhodococcus* sp. S67 проникают внутрь нефтяных капель, а клетки *Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142) локализуются на поверхности этих капель (Рис. 10).

С помощью электронной микроскопии у псевдомонад и родококков было также продемонстрировано наличие экзоцеллюлярных компонентов, которые, возможно, являются биоэмульгаторами (Рис. 11 и 12). При культивировании ассоциации, состоящей из двух штаммов (*Rhodococcus* sp. S67 + *Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142)), выявлено наличие (образование) капсульной оболочки вокруг микробных клеток.



Pseudomonas putida BS3701(pBS1141, pBS1142)



Rhodococcus sp. S67

Рис. 10 Чистые культуры микроорганизмов в процессе деструкции нефти (световая микроскопия). МК – микробные клетки, НК – нефтяная капля.

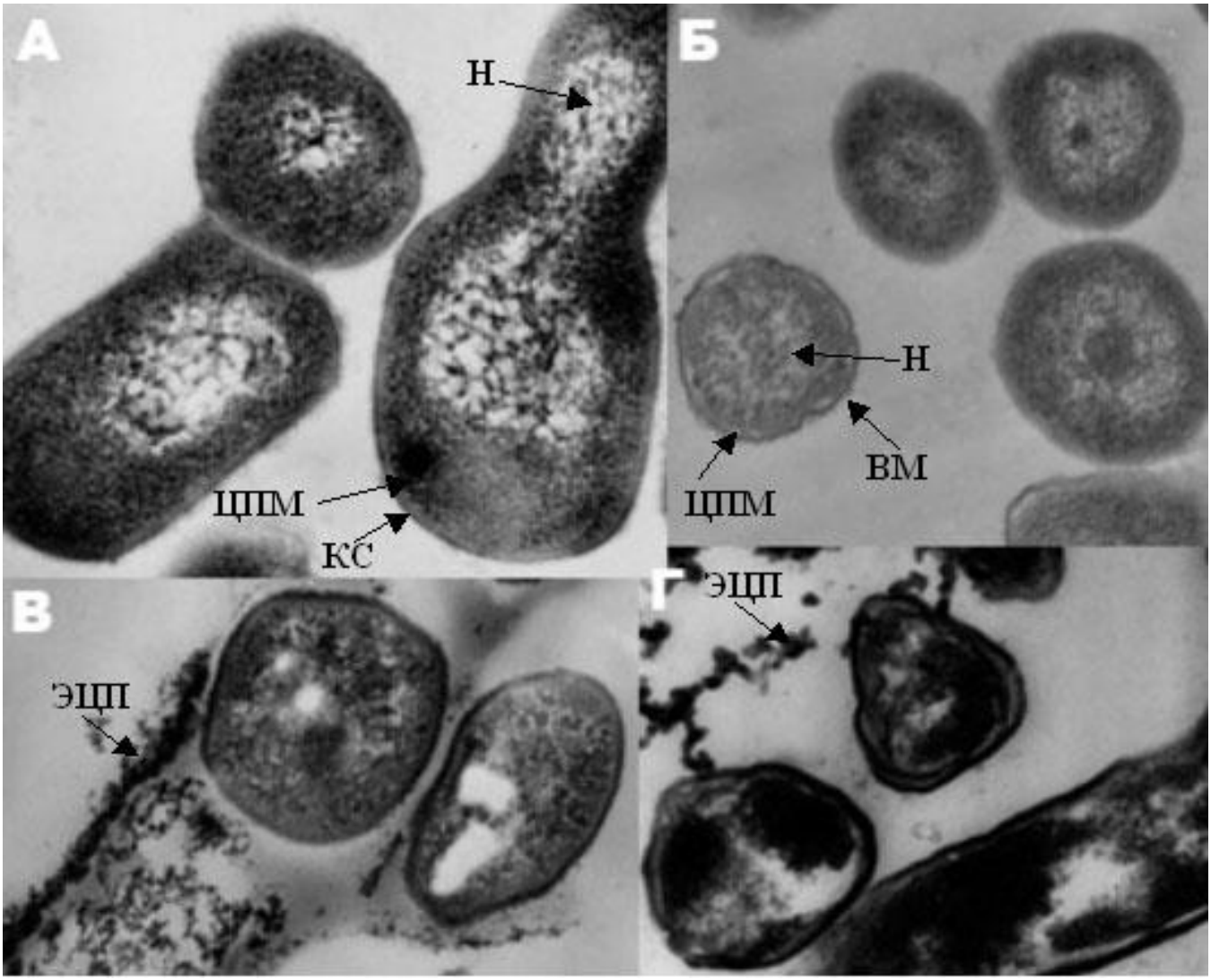


Рис. 11 Электронная микроскопия. Цитохимическая реакция на полисахариды с рутением красным. А - Rhodococcus sp. S67 рост на глюкозе, Б - Pseudomonas putida BS3701(pBS1141, pBS1142) рост на глюкозе, В - Rhodococcus sp. S67 рост на нефти, Г - Pseudomonas putida BS3701(pBS1141, pBS1142) рост на нефти. Стрелкой показано формирование экзоцеллюлярной пленки (ЭЦП). ЦПМ – цитоплазматическая мембрана, ВМ – внешняя мембрана, КС – клеточная стенка, Н – нуклеоид.

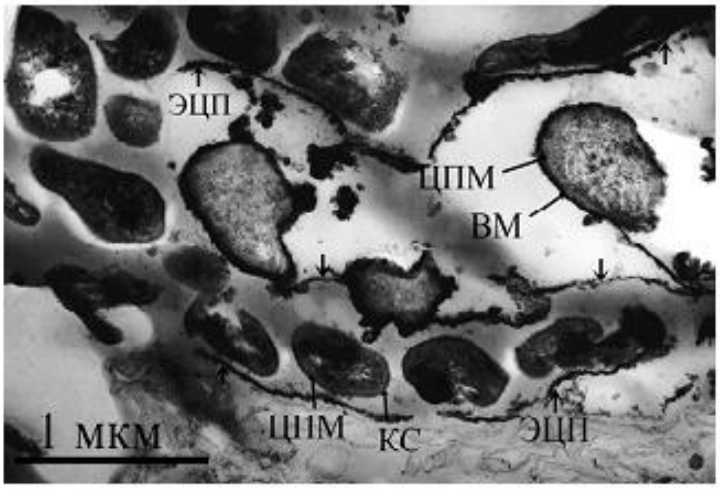


Рис. 12 Электронная микроскопия. Цитохимическая реакция на полисахариды. Рост на нефти ассоциации, состоящей из штаммов S67 и BS3701. Стрелкой показано формирование экзоцеллюлярной пленки (ЭЦП). ЦПМ – цитоплазматическая мембрана, ВМ – внешняя мембрана, КС – клеточная стенка, Н – нуклеоид.

3.1.1.3. Идентификация и генотипирование штаммов-деструкторов нефти

Семь наиболее активных грамположительных штаммов-деструкторов нефти X5, X25, S25, S26, S67 и Ars38 на основании определения частичной нуклеотидной последовательности генов 16S рРНК были идентифицированы как представители рода *Rhodococcus*, а Ars25 – как *Microbacterium*. Для дальнейшей характеристики наиболее активных микроорганизмов-деструкторов использовали метод геномных фингерпринтов с применением ПЦР с универсальным праймером BoxA1R. Из данных рисунка 13 видно сходство четырёх штаммов *Rhodococcus* sp. S67, *Rhodococcus* sp. S25, *Rhodococcus* sp. S26 и *Rhodococcus erythropolis* Sh5. Для установления различий данных штаммов использовали рестрикционный анализ их амплифицированной 16S рДНК (ARDRA). Для этого из исследуемых штаммов выделяли тотальную ДНК и использовали её как матрицу для амплификации гена 16S рРНК. Продукт амплификации обрабатывали двумя эндонуклеазами рестрикции *Hpa*II и *Rsa*I (Рис. 14). Как видно из данных рисунка 14, рестрикционные профили всех исследованных штаммов различались, за исключением штаммов *Rhodococcus* sp. S25 и *Rhodococcus erythropolis* Sh5, профили которых имели значительное сходство.

Таким образом, полученные результаты (ARDRA) позволяют различать штаммы родококков в смешанных культурах и могут быть использованы для их мониторинга в модельных системах в лабораторных и полевых условиях.

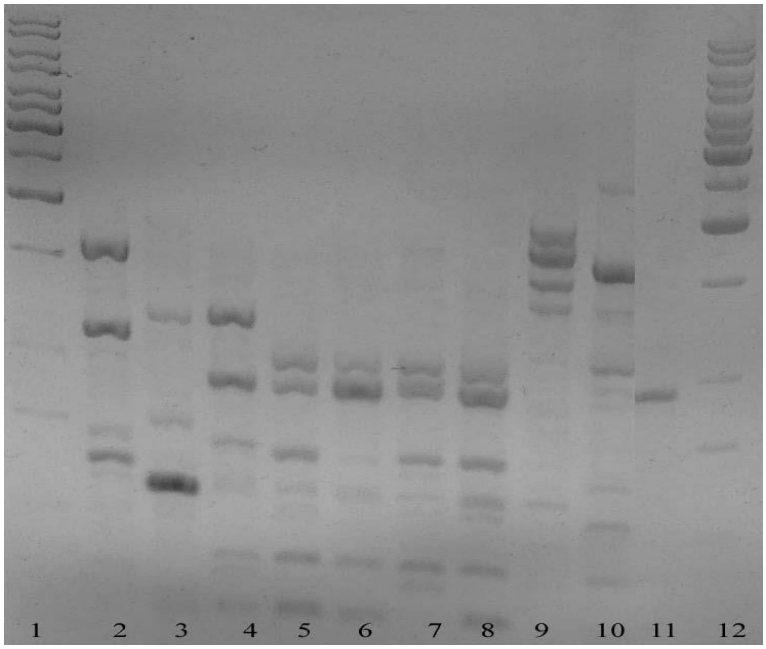


Рис. 13 Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймером BoxA1R. 1, 12 – 1 т.п.н. ДНК маркер; 2 – грамотрицательный штамм S41; 3 – Pseudomonas sp. 142NF(pNF142); 4 – Rhodococcus sp. X25; 5 – Rhodococcus sp. S67; 6 – Rhodococcus sp. S25; 7 – Rhodococcus erythropolis Sh5; 8 – Rhodococcus sp. S26; 9 – Pseudomonas aureofaciens 1393(pNF142::TnMod-OTc); 10 – Pseudomonas putida KT2442(pNF142::TnMod-OTc); 11 – Rhodococcus sp. X5.

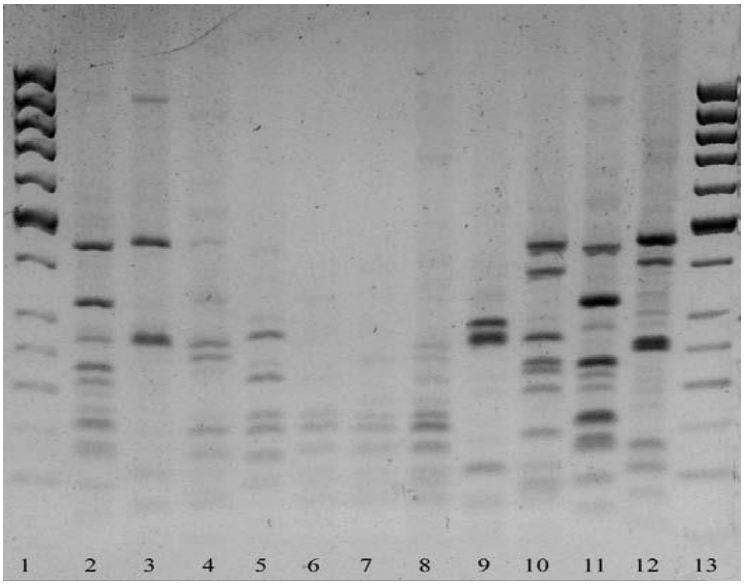


Рис. 14 Электрофореграмма картины рестрикции ампликонов 16S рДНК ферментами HpaII и RsaI. 1, 13 – 50 п.н. ДНК маркер; 2 – грамотрицательный штамм S41; 3 – Pseudomonas sp. 142NF(pNF142); 4 – Rhodococcus sp. X25; 5 – Rhodococcus sp. S67; 6 – Rhodococcus sp. S25; 7 – Rhodococcus erythropolis Sh5; 8 – Rhodococcus sp. S26; 9 – Pseudomonas aureofaciens 1393(pNF142::TnMod-OTc); 10 – Pseudomonas putida KT2442(pNF142::TnMod-OTc); 11 – грамотрицательный штамм S22; 12 – Rhodococcus sp. X5.

3.1.1.4. Биодеструкция нефти исследованными микроорганизмами

Деградацию нефти исследованными штаммами оценивали по суммарному показателю её убыли в жидкой среде, определяемому весовым методом (гравиметрия). Исследование степени деструкции нефти в жидкой минеральной среде показало, что индивидуальные штаммы способны разлагать от 15 до 26% нефти (за исключением Ars38) при 24°С в течение 7-10 сут и от 28 до 47% при 4°С в течение 10-20 сут. У 8 из 9 отобранных микроорганизмов степень деструкции нефти при 4ºС оказалась выше, чем при 24ºС (Рис. 15).

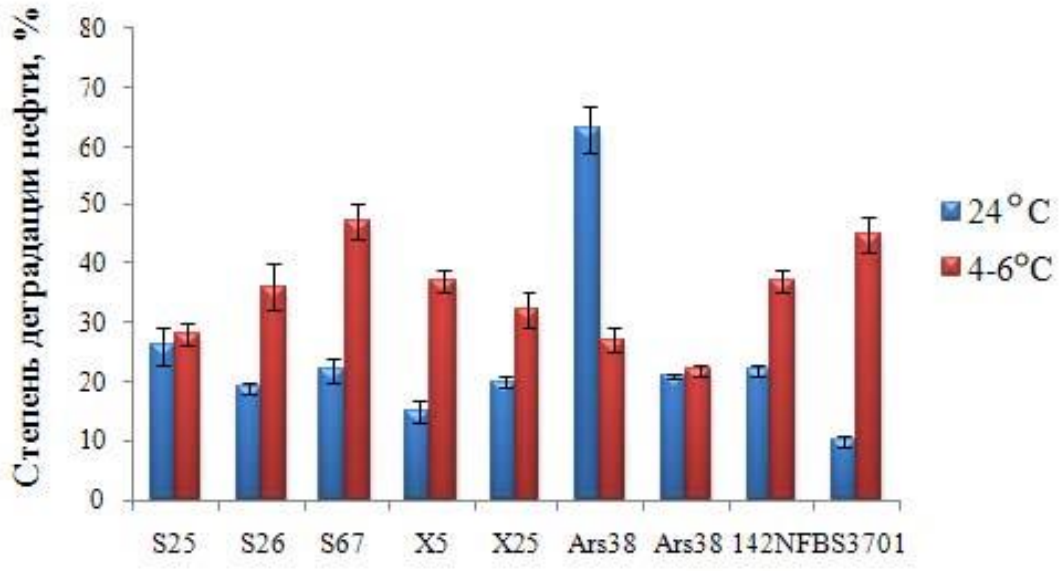


Рис.15 Деградация нефти отдельными штаммами микроорганизмов при 24ºС и 4ºС.

3.1.1.5. Изменение фракционного состава нефти после биодеградации

Для оценки изменения состава нефти после биодеградации ее бактериями проводили фракционирование образцов на микроколонках с оксидом алюминия (Табл. 14). Для большинства штаммов микроорганизмов отмечена способность к деструкции в первую очередь лёгких фракций нефти и твёрдых парафинов. Естественно, что при этом изменялось относительное содержание в остаточной нефти фракций полиароматических углеводородов, бензольных и спирто-бензольных смол. Так, штаммы *Rhodococcus* sp. S25, *Rhodococcus* sp. S26, *Rhodococcus* sp. S67, *Rhodococcus* sp. X5 и *Rhodococcus* sp. X25 наиболее эффективны в качестве деструкторов парафино-нафтеновых и ароматических углеводородов (выделено красным цветом). Штаммы *Pseudomonas fluorescens* 142NF(pNF142), *Rhodococcus* sp. S25, *Rhodococcus* sp. S67 и *Rhodococcus* sp. X5 наряду с парафино-нафтеновыми, моно- и полиароматическими углеводородами эффективно разлагали асфальтено-смолистые компоненты нефти.

Табл. 14. Изменение фракционного состава нефти после её разложения микроорганизмами.

Штамм	Остаточное содержание фракций нефти в пробах после деструкции, %						Убыль фракций нефти относительно содержания в контроле, %					
	Гексановая фракция, %		Бензольная фракции, %		Бензольно-спиртовал фракция, %		Гексановая фракция, %		Бензольная фракция, %		Бензольно-спиртовая фракция, %	
	24°С	4°С	24°С	4°С	24°С	4°С	24°С	4°С	24°С	4°С	24°С	4°С
Rhodococcus sp. S25	38	47	14	11	5	5	37	22	15	26	24	38
Rhodococcus sp. S26	41	40	16	9	7	5	34	33	6	38	б	38
Rhodococcus sp. S67	42	34	16	9	6	4	31	43	5	38	12	50
Rhodococcus sp. X5	44	40	22	10	6	5	28	33	30	31	13	38
Rhodococcus sp. X25	39	45	15	10	6	6	36	25	13	28	13	25
Pseudomonas sp. 142NF(pNF142)	48	42	13	10	6	3	21	30	23	33	19	38
Pseudomonas putida BS3701 (pBS1141, pBS1 142)	61	н/о	17	н/о	11	н/о	2	н/о	11	н/о	37	н/о
Контроль (исходная нефть)	61	60	17	15	7	8	0	0	0	0	0	0

3.1.2 Выбор и характеристика микроорганизмов-нефтедеструкторов по способности к деградации высоких концентраций нефти при повышенных концентрациях морской соли и в широком температурном и pH-диапазонах

3.1.2.1. Физиологическая характеристика штаммов – нефтедеструкторов

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.

7 эффективных штаммов микроорганизмов, способных к росту в широком диапазоне температур, отобранных на первом этапе работы (раздел 3.1.1), и 10 бактерий из коллекции коммерческой компании ЗАО «Биоойл» (Табл. 15) были исследованы на способность к деградации высоких концентраций нефти (до 40%), в условиях повышенной солености (до 10%) и в широком диапазоне pH.

Для исследуемых микроорганизмов был определён температурный диапазон, способность продуцировать биоэмульгаторы, галотолерантность, спектр утилизируемых субстратов, антибиотикорезистентность (п. 3.1.1.1) и диапазон pH.

Все исследуемые микроорганизмы способны к росту на нефти, дизельном топливе, мазуте и гексадекане (Табл. 15). Использование нафталина в качестве единственного источника углерода и энергии было обнаружено у штаммов S25, 142NF и F701, причем только два последних микроорганизма способны утилизировать салицилат. F701 деградировал фенантрен. Штаммы S25, S67, F701, 5 и 1B обладали способностью использовать толуол в качестве единственного источника углерода и энергии. Деградация бензоата была обнаружена у штаммов бактерий S67, X5, X25, 142NF и F701. Все исследуемые штаммы не были способны к деструкции камфары, гентизата, м-/о-/п-ксилола, капролактама, этилбензола и 3,4-дигидроксибензоата.

Табл. 15. Характеристика штаммов, использованных в работе.

Штамм	Характеристика штамма
1A	Nb^r Nal^r Sm^r Cla^r Amp^r Rif^r Tp^r Cef^r Bzp^r Tc^r Phn^+ $Npht^+$ Dsf^+Hde^+ Oct^- Dec^- Tol^- Bnz^- Cam^- Phn^- Sal^- Xyl^- Non^- Nah^-
Acinetobacter baumannii 1B	Nb^r Cef^r Bzp^r Rif^r Amp^r Tc^r Oct^+ Dec^+ Non^+ Tol^+ $Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Cam^- Phn^- Nah^- Sal^- Xyl^- $Ebnz^-$ Bnz^+
2A	Tc^r Tp^r Nal^r Rif^r Cef^r Bzp^r Oct^+ Dec^+ Non^+ $Npht^+$ Dsf^+Hde^+ Cam^- Phn^- Nah^- Sal^- Xyl^- $Ebnz^-$ Tol^- Bnz^-
2B	Tc^r Nb^r Tp^r Nal^r Rif^r Cef^r Bzp^r Oct^+ Dec^+ Non^+ $Npht^+$ Dsf^+Hde^+ Cam^- Phn^- Nah^- Sal^- Xyl^- $Ebnz^-$ Tol^- Bnz^-
2C	Nb^r Tp^r Nal^r Rif^r Cef^r Bzp^r Oct^+ Dec^+ Non^- $Npht^+$ Dsf^+Hde^+ Cam^- Phn^- Nah^- Sal^- Xyl^- $Ebnz^-$ Tol^- Bnz^-
3	Tp^r Cla^r Nal^r Rif^r Cef^r Bzp^r Oct^- Dec^+ Non^+ $Npht^+$ Dsf^+Hde^+ Cam^- Phn^- Nah^- Sal^- Xyl^- $Ebnz^-$ Tol^- Bnz^-
4	Nb^r Amp^r Rif^r Cef^r Bzp^r $Npht^+$ Dsf^+Hde^+ Cam^- Phn^- Nah^- Sal^- Xyl^- $Ebnz^-$ Tol^- Bnz^- Oct^- Non^+
5	Rif^r Cef^r Bzp^r Amp^r Nal^r Cla^r Tp^r Oct^+ Dec^+ Non^+ Tol^+ $Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Cam^- Phn^- Nah^- Sal^- Xyl^- $Ebnz^-$ Bnz^-
Serratia sp. 6	Rif^r Cef^r Bzp^r Amp^r Nb^r Oct^+ Dec^+ Non^+ $Npht^+$ Dsf^+Hde^+ Cam^- Phn^- Nah^- Sal^- Xyl^- $Ebnz^-$ Tol^- Bnz^-
Acinetobacter baumannii 7	Nb^r Cef^r Bzp^r Rif^r Amp^r Tp^r Oct^+ Dec^+ Non^+ $Npht^+$ Dsf^+Hde^+ Cam^- Phn^- Nah^- Sal^- Xyl^- $Ebnz^-$ Tol^- Bnz^-
Rhodococcus sp. S25	Sm^r Oct^+ Dec^+ Non^+ Tol^+ Nah^+ $Npht^+$ Dsf^+Hde^+
Rhodococcus erythropolis S26	Sm^r Rif^r Oct^+ Dec^+ Non^+ $Npht^+$ Dsf^+Hde^+
Rhodococcus sp. S67	Km^r Sm^r $Benz^+Oct^+$ Dec^+ Non^+ Tol^+ $Npht^+$ Dsf^+Hde^+
*Rhodococcus sp.*X5	Km^r Cla^r Cef^r Bzp^r Gm^r Sm^r $Benz^+$ Oct^+ Dec^+ Non^+ $Npht^+$ Dsf^+Hde^+
Rhodococcus sp. X25	Km^r $Benz^+Oct^+$ Dec^+ Non^+ $Npht^+$ Dsf^+Hde^+
Pseudomonas sp. 142NF	Cla^r Cef^r Bzp^r Amp^r Tc^r $Benz^+$ Sal^+ Nah^+ $Npht^+$ Dsf^+Hde^+ Tol^-
Pseudomonas putida F701	Tc^r Cef^r Bzp^r Nb^r Cam^+ $Benz^+$ Tol^+ Phn^+Sal^+ Nah^+ $Npht^+$ Dsf^+Hde^+

Способность к росту на: Phn^+ - фенантрене, Nah^+ - нафталине, Sal^+ - салицилате, Dsf^+ - дизельном топливе, $Npht^+$ - нефти, Hde^+ - гексадекане, Gnt^+ – гентизиновой кислоте, Sal^+- салицилате, Cam^+- камфоре, Hna^+-

1-гидрокси-2-нафтоате, Tol^+ - толуоле, Xyl^+ - ксилоле, Mna^+ - 2-метилнафталине, Oct^+- октане, Dec^+- декане, Non^+ - нонане, $Benz^+$ - бензоате; Bnz^+ - бензоле; $Ebnz^+$ - этилбензоле; Gfp^+ – наличие зеленого флюоресцирующего белка; Cys^- – ауксотрофность по цистеину; резистентность к антибиотикам: Cef^r– цефазолину, Bzp^r – бензилпенициллину, Nb^r – новобиоцину, Tc^r – тетрациклину, Rif^r – рифампицину, Tp^r – триметаприму, Sm^r- стрептомицину, Amp^r –ампициллину, Cla^r – клафорану, Km^r – канамицину, Gm^r – гентамицину, Nalr – налидиксовой кислоте.

Штаммы из коллекции ЗАО «Биоойл» представлены без заливки, штаммы из коллекции лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН выделены серой заливкой.

Устойчивость к 5% морской соли при загрязнении жидкой минеральной среды 2% дизельного топлива была выявлена у всех 17 бактерий. Штаммы 142NF и 2B утилизировали дизельное топливо в присутствии 7% соли, а микроорганизм X5 – 10%.

Штаммы из коллекции лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН способны деградировать дизельное топливо в диапазоне pH среды 5 – 7, а микроорганизмы S25, S26 и F701 – при pH 8. Практически все бактерии из коллекции ЗАО «Биоойл», за исключением штаммов 2C, 3, 4 и 5, были способны к росту в жидкой минеральной среде, содержащей 2% дизельного топлива в диапазоне pH 5 – 9. Для штаммов 1B, 2A, 6 и 7 наблюдался рост при более кислых (pH 4) и более щелочных (pH 10) значениях.

Все 17 исследуемых микроорганизмов способны деградировать нефть и нефтепродукты (дизельное топливо) (2%) в температурном диапазоне 4 – 30 °C. Разрушение загрязнителя (нефть или дизельное топливо) при температуре 42°C было выявлено у штаммов бактерий F701, 1B, 6, 7, S26 и S25.

Была проведена оценка роста бактерий в жидкой минеральной среде Эванса с добавлением различных концентраций нефти при температурах 24°C и 4 °C после 10 суток культивирования (Табл. 16). В жидкой минеральной среде с концентрацией нефти 40% при температуре 24ºC росли штаммы S25, S26, 1B, 6 и F701, а при 4°C в аналогичных условиях – только штамм S26. Бактерии S25, S26, 1B, 6, F701, X25 и 7 росли на среде с нефтью в концентрации 30% при комнатной температуре, а при температуре 4°C - только штаммы 6, 7 и S26 (Табл. 16).

Табл. 16. Рост микроорганизмов в минеральной среде Эванса с добавлением различных концентраций нефти при температурах 24°С и 4°С после 10 суток культивирования.

Штамм	Концентрация нефти (по объему), %									
	10		15		20		30		40	
	24° С	4 °С	24° С	4 °С	24° С	4 °С	24° С	4 °С	24°С	4 °С
1A	2	1	1	-	-	-	-	-	-	-
1B	2	2	2	2	2	-	1	-	1	-
2A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	2	2	1	1	-	-	-	-	-	-
4	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	3	3	3	3	2	2	2	1	2	-
7	2	2	1	2	1	1	1	1	-	-
S25	2	3	3	1	2	1	2	-	2	-
S26	2	3	3	3	2	3	2	3	2	3
S67	1	2	1	1	-	-	-	-	-	-
X5	1	2	1	1	-	-	-	-	-	-
X25	1	-	1	-	1	-	1	-	-	-
F701	2	2	2	1	2	1	1	-	1	-
142NF	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: - отсутствие роста
1- рост
2 - хороший рост
3 - очень хороший рост

В условиях культивирования микроорганизмов в жидкой минеральной среде с дизельным топливом (Табл. 17) в концентрации 40% и с добавлением 3% морской соли при температуре 24°С рост был отмечен для штаммов F701,1B, S26, 2C и 6, а при 4 °С – для штаммов 1B и S26. Бактерии F701,1B, S26, 2C, 7 и 6 росли в среде с дизельным топливом при его концентрации 30% в присутствии 3% морской соли при 24°С, а при 4 °С - штаммы F701,1B, S26, 7 и 6 (Табл. 17).

Табл. 17. Рост микроорганизмов в минеральной среде Эванса с добавлением различных концентраций дизельного топлива и 3% морской соли при температурах 24°C и 4°C после 10 суток культивирования.

Штамм	Концентрация дизельного топлива (по объему), %									
	10		15		20		30		40	
	24° C	4 °C	24° C	4 °C	24° C	4 °C	24° C	4 °C	24° C	4 °C
1A	2	3	1	1	1	-	-	-	-	-
1B	3	3	3	3	2	3	2	1	1	1
2A	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-
2B	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
2C	1	1	1	-	1	-	1	-	1	-
3	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-
4	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	3	3	3	3	3	3	2	1	1	-
7	3	2	2	2	1	1	1	1	-	-
S25	2	2	-	1	-	-	-	-	-	-
S26	3	3	3	3	1	2	2	1	1	1
S67	3	2	2	1	1	-	-	-	-	-
X5	2	3	1	3	1	1	-	-	-	-
X25	3	2	1	1	-	-	-	-	-	-
F701	2	3	2	3	2	1	1	1	1	-
142NF	1	2	1	1	-	-	-	-	-	-

Примечание: - отсутствие роста
1- рост
2 - хороший рост
3 - очень хороший рост

Важным свойством, обуславливающим способность бактерий усваивать углеводороды, является продукция ими поверхностно-активных веществ биологической природы, которые диспергируют нефтепродукты и увеличивают биодоступность углеводородов для микроорганизмов. Как известно, микроорганизмы, продуцирующие биоэмульгаторы, проявляют высокую поверхностную активность при росте на гидрофобных органических субстратах. Как видно из данных таблицы 18, практически все исследованные микроорганизмы обладали высокой эмульгирующей активностью. Полученные данные позволяют отнести биосурфактанты, продуцируемые исследованными микроорганизмами, за исключением штаммов 2B, S26, S67, 142NF, X25, F701 и 5, к эндо-типу: оптическая плотность культуральной жидкости после центрифугирования в присутствии гексадекана была низкой, поскольку продуцируемые ими биоэмульгаторы связаны с

клеточной стенкой. Штаммы 2B, S26, S67, 142NF, X25, F701 и 5 продуцируют биосурфактанты экзо-типа, не связанные с клеточной стенкой.

Наибольшие значения индекса эмульгирования были отмечены для штаммов 1B, 7, X5, S26, S67 и F701, что свидетельствует о стабильности эмульсий и высокой поверхностной активности (Табл.18, выделены серой заливкой).

Табл. 18. Эмульгирующая активность исследуемых микроорганизмов при 24ºC.

Штамм	Поверхностная активность		Индекс эмульгирования, % через 24 часа
	Визуально*	Оптическая плотность супернатанта, при λ=540нм	
1A	3	0,03	21,8
***Acinetobacter baumannii* 1B**	3	0,03	46,7
2A	4	0,08	10,9
2B	4	1,01	10,6
2C	2	0,01	17,0
3	4	0,04	14,6
4	1	0,01	1,8
5	4	0,71	22,8
Serratia sp. 6	1	0,01	10,5
***Acinetobacter baumannii* 7**	3	0,05	51,5
***Rhodococcus* sp. X5**	4	0,167	43,2
Rhodococcus sp. X25	4	0,640	21,3
Rhodococcus sp. S25	4	0,135	8,8
***Rhodococcus erythropolis* S26**	4	2,280	47,4
***Rhodococcus* sp. S67**	3	1,663	47,5
Pseudomonas sp. 142NF	4	1,590	2,5
***Pseudomonas putida* F701**	4	1,033	50,1

* по методу Francy et al., 1991

С целью сравнения эффективности исследуемых штаммов была определена степень деструкции и фракционный состав остаточной нефти после культивирования микроорганизмов в течение 10 суток в жидкой минеральной среде с концентрацией нефти 2% при 24 °С и при 4 ºС.

Табл. 19. Степень деструкции и изменение фракционного состава нефти после ее деградации микроорганизмами из коллекции лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН при росте в жидкой минеральной среде с концентрацией нефти 2% при 24 °С и при 4 ºС после 10 суток культивирования.

Штамм	Степень деструкции нефти, %		Остаточное содержание фракций нефти в пробах после деструкции, %						Убыль фракций нефти относительно содержания в контроле, %					
			Гексановая фракция, %		Бензольная фракция, %		Бензольно-спиртовая фракция, %		Гексановая фракция, %		Бензольная фракция, %		Бензольно-спиртовая фракция, %	
	24ºС	**4ºС**	24ºС	4ºС	24ºС	4ºС	24°С	4ºС	**24ºС**	**4ºС**	**24ºС**	**4ºС**	**24ºС**	**4ºС**
S25	26	**28**	38	47	14	11	5	5	**37**	22	15	**26**	**24**	**38**
S26	18	**35**	41	40	16	9	7	5	**34**	33	6	**38**	6	**38**
S67	21	**46**	42	34	16	9	6	4	**31**	**43**	5	**38**	12	**50**
X5	13	**36**	44	40	22	10	6	5	**28**	**33**	**22**	**31**	13	**38**
X25	20	**30**	39	45	15	10	6	6	**36**	25	13	**28**	13	**25**
142 NF	9	**44**	48	42	13	10	6	5	**21**	**30**	**23**	**33**	**19**	**38**
F701	21	**39**	47	н/о	10	н/о	5	н/о	**24**	н/о	**33**	н/о	**37**	н/о
Контроль (нефть без микроорганизмов)			61	60	17	15	7	8	0	0	0	0	0	0

Для большинства штаммов микроорганизмов была отмечена способность к деструкции в большей степени лёгких фракций нефти и твёрдых парафинов при температуре 24°С (гексановая фракция) - убыль составила 21-37% (Табл.19). Наибольшая убыль бензольной фракции наблюдалась для штаммов *Rhodococcus* sp. X5, *Pseudomonas* sp. 142NF, F701 (22-33%), а бензольно-спиртовой (асфальтено-смолистые компоненты нефти) – при икультивировании штаммов *Rhodococcus* sp. S25, *Pseudomonas* sp. 142NF, F701 (19-37%). Следует отметить, что при пониженной температуре убыль гексановой фракции была выше при интродукции штаммов *Rhodococcus* sp. X5, *Rhodococcus* sp. S67, *Pseudomonas* sp. 142NF по сравнению с данными при температуре 24°С. Убыль бензольной и бензольно-спиртовой фракций для всех штаммов, также как и деструкция нефти была выше при температуре 4°С.

Штаммы из коллекции ЗАО «Биоойл» характеризовались по сравнению с эффективными штаммами из коллекции лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН меньшей убылью гексановой фракции (15-23%), бензольной (1-20%) и бензольно-спиртовой (9-26%) при температуре 24°С (Табл. 20). Следует отметить, что для этих

штаммов убыль всех фракций как и степень деструкции нефти при температуре 4°С была меньше, чем при 24°С.

Табл. 20. Степень деструкции и изменение фракционного состава нефти после ее разложения микроорганизмами из коллекции ЗАО «Биоойл» при росте в жидкой минеральной среде с концентрацией нефти 2% при 24 °С и при 4 ºС . после 10 суток культивирования.

Штамм	Степень деструкции нефти, %		Остаточное содержание фракций нефти в пробах после деструкции, %						Убыль фракций нефти относительно содержания в контроле, %					
			Гексановая фракция, %		Бензольная фракция, %		Бензольно-спиртовая фракция, %		Гексановая фракция, %		Бензольная фракция, %		Бензольно-спиртовая фракция, %	
	24ºС	**4ºС**	24ºС	4ºС	24ºС	4ºС	24°С	4ºС	**24ºС**	4ºС	**24°С**	4ºС	**24ºС**	4ºС
1А	**17,9**	**8,8**	57	52	13	26,0	11	24	**17**	21	**17**	н/о	**23**	11
1В	**13,7**	**5,1**	58	63	13	20,2	12	19	**15**	6	**15**	н/о	**18**	9
2А	**14,7**	**11,6**	54	50	15	26,7	11	24	**21**	25	**5**	н/о	**24**	10
2В	**17,2**	**11,6**	53	57	15	19,9	11	18	**23**	14	**2**	н/о	**25**	13
2С	**18,8**	**7,8**	53	58	12	21,0	10	19	**23**	13	**20**	н/о	**26**	6
3	**14**	**10,6**	58	58	14	19,1	13	17	**16**	13	**12**	н/о	**9**	16
4	**11,9**	**7,6**	58	61	15	19,1	12	18	**15**	8	**1**	н/о	**13**	15
5	**14,1**	**8,8**	56	56	15	22,1	12	20	**19**	16	**6**	н/о	**15**	12
6	**15,3**	**5,4**	56	64	13	17,6	12	17	**19**	4	**16**	2	**13**	7
7	**16,5**	**6,4**	55	63	14	22,3	12	21	**19**	5	**12**	н/о	**17**	0
Контроль (исходная нефть)			69	67	17	17	14	14	0	0	0	0	0	0

После определения основных физиолого-морфологических характеристик штаммов, была проведена идентификация наиболее активных микроорганизмов-нефтедеструкторов. Штаммы 1В и 7 на основании частичного определения нуклеотидной последовательности генов 16S рРНК были идентифицированы как *Acinetobacter baumannii*, микроорганизм F701 - *Pseudomonas putida*, а бактерия 6 - *Serratia* sp. (характеристики штаммов приведены в таблице 15).

Далее все исследуемые на данном этапе работы 17 штаммов-деструкторов были проанализированы на наличие катаболических плазмид.

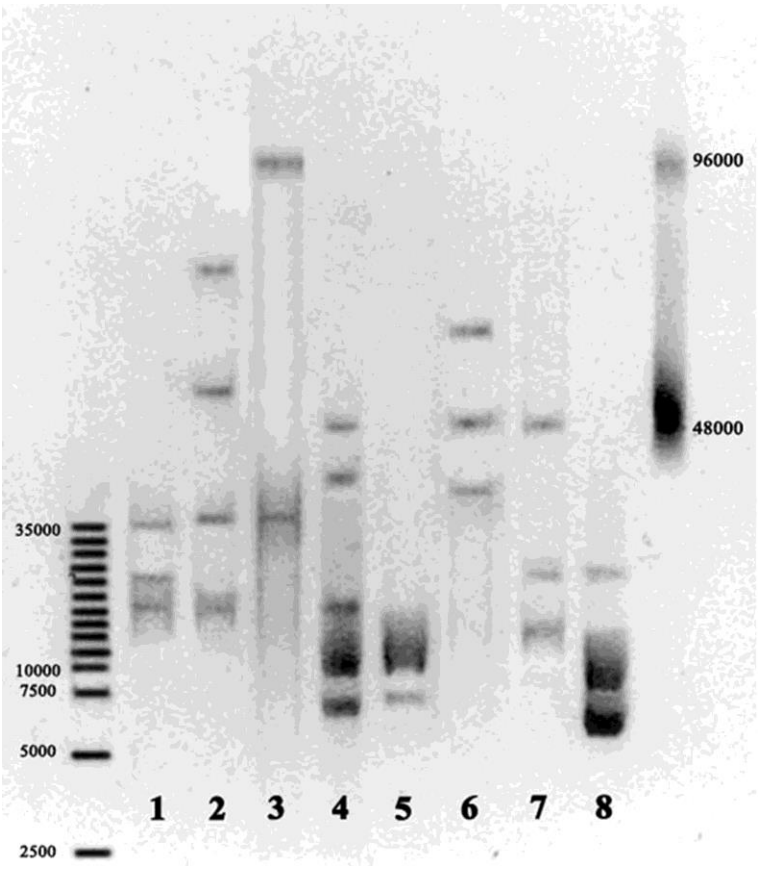


Рис. 16 Электрофореграмма плазмидных ДНК штаммов-деструкторов

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 1B (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.)

ДНК-маркер, λ Ladder PFG маркер

Как видно из данных рисунка 16, присутствие плазмид было выявлено в штаммах 1B, 4, 6, 7, S26, X25, S25 и F701. Штамм *Pseudomonas* sp. 142NF, содержит плазмиду p142NF (Табл. 9).

Для выяснения возможности локализации генов биодеградации нафталина (штамм F701) или гексадекана (штаммы 1B, 4, 6, 7, S26, X25 и S25) на плазмидах, выявленных у исследуемых бактерий, были проведены эксперименты по спонтанной

элиминации плазмид путем культивирования штаммов в неселективных условиях (на ЛБ-среде). В результате было установлено, что длительное культивирование в богатой среде микроорганизмов *Pseudomonas putida* F701 и 4 приводило к появлению в популяциях бесплазмидных вариантов. У полученных элиминантов отсутствовала способность к деградации нафталина и гексадекана, соответственно.

В неселективных условиях плазмиды стабильно наследовались в штаммах 1B, 6, 7, S26, X25 и S25. В результате инкубации клеток бактерий 1B, 6, 7, S26 и S25 в присутствии бромистого этидия (10 мкг/мл) были получены элиминанты, утратившие способность расти на средах, содержащих гексадекан. Высокая частота потери признака деструкции гексадекана при обработке элиминирующим агентом позволила предположить плазмидный контроль деградации поллютанта у этих штаммов.

Для определения возможной конъюгативности плазмид были поставлены скрещивания, в которых в качестве донора использовали аборигенные деструкторы нафталина F701 и 142NF и деструкторы гексадекана 1B, 4, 6, 7, S25, S26, а реципиентом был бесплазмидный штамм *Pseudomonas putida* KT2442. Селекцию вели по признаку способности к росту на нафталине или гексадекане, а контрселекция осуществлялась по канамицину. Трансконъюганты были получены только в скрещиваниях реципиента KT2442 с донорными штаммами F701 и 142NF, они были способны к росту на нафталине. Полученные плазмидосодержащие варианты штамма KT2442, имеющие в составе хромосомы *gfp* ген, легко обнаруживались путем высева на агаризованную среду LB: колонии давали характерное зеленое свечение в ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм), обусловленное наличием в клетке флюоресцирующего белка. Кроме того, они обладали хромосомными генами резистентности к рифампицину и канамицину. Частота переноса плазмид составила 3 – 5 $\times 10^{-6}$ на клетку донора. Для подтверждения переноса плазмид были проведены эксперименты по выделению плазмидной ДНК, которые выявили наличие идентичных по размеру плазмид как в аборигенных донорных микроорганизмах, так и в полученных трансконъюгантах. Плазмиды штаммов 7, 4, 1B, S25, 6 и S26 не удалось передать в реципиентный штамм *Pseudomonas putida* KT2442.

3.2 Влияние катаболических плазмид на биодеградацию углеводородов нефти

3.2.1. Биодеградация нефти бесплазмидными и плазмидосодержащими микроорганизмами – деструкторами полициклических ароматических углеводородов в жидкой минеральной среде

В работе использовались 3 различные плазмиды биодеградации нафталина Inc P-9 группы несовместимости: pNF142::Tn*Mod*-OTc, pBS216, pOV17, которые путем конъюгации и электропорации были перенесены в различные виды бактерий рода *Pseudomonas: P. putida, P. aureofaciens, P. chlororaphis* (Anokhina et.al., 2006).

В ходе настоящей работы плазмида pNF142::Tn*Mod*-OTc была передана из ауксотрофного штамма BS394(pNF142::Tn*Mod*-OTc) в ризосферный бесплазмидный штамм PCL1391 путем конъюгационного переноса с частотой 10^{-8} на клетку донора. Селекцию осуществляли по способности к росту на нафталине. Доказательством отсутствия нарушения экспрессии плазмидных генов, ответственных за биодеградацию нафталина, являлась способность полученного трансконъюганта эффективно утилизировать нафталин.

Для исследуемых плазмидосодержащих штаммов и их бесплазмидных вариантов были определены спектр утилизируемых субстратов (Табл.21) и антибиотикорезистентность.

Как показали результаты проведенных исследований, все использованные в работе штаммы псевдомонад были способны к росту на нефти, дизельном топливе, гексадекане или сукцинате. При выращивании микроорганизмов на минимальной агаризованной среде Эванса с добавлением толуола, октана, бифенила, п-крезола, м-крезола, о-крезола или нафтиламина роста как плазмидосодержащих, так и бесплазмидных штаммов не наблюдалось. При использовании таких субстратов, как нафталин, фенантрен, 2-метилнафталин, 1-гидрокси-2-нафтоат, салицилат или бензоат только плазмидосодержащие псевдомонады были способны к утилизации этих углеводородов, что обусловлено экспрессией плазмидных генов в клетках бактерий-хозяев. Штаммы *P. aureofaciens* BS1393(pOV17), BS1393(pBS216), BS1393(pNF142::Tn*Mod*-OTc), *P. chlororaphis* PCL1391(pOV17), PCL1391(pBS216), PCL1391(pNF142::Tn*Mod*-OTc) способны расти на бензоле.

Табл. 21. Характеристики штаммов, использованных в работе.

Штамм	Характеристика штамма
Pseudomonas putida BS394	Cys^- $Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Phn^- Nah^- Sal^- Mna^- $Benz^-$ Bnz^- Hna^- Xyl^- Oct^- Bzp^r Amp^r Nal^r Rif^r
Pseudomonas putida BS394 (pNF142::Tn*Mod*-Otc)	Cys^- Nah^+ Phn^+ Sal^+ $Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Tc^r Tol^- Mna^+ $Benz^+$ Bnz^- Hna^+ Amp^r Nal^r Rif^r Bzp^r
Pseudomonas putida BS394 (pBS216)	Cys^- Phn^+ Nah^+ Sal^+ $Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Amp^r Nal^r Rif^r Bzp^r Tol^- Mna^+ $Benz^+$ Bnz^- Hna^+
Pseudomonas chlororaphis PCL1391	$Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Phn^- Nah^- Sal^- Mna^- $Benz^-$ Bnz^- Hna^- Xyl^- Oct^- Amp^r Nal^r Bzp^r Cef^r Cla^r
Pseudomonas chlororaphis PCL1391(pNF142::Tn*Mod*-OTc)	Phn^+ Nah^+ Sal^+ Tc^r $Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Amp^r Nal^r Bzp^r Cef^r Cla^r Tol^- Mna^+ $Benz^+$ Hna^+ Xyl^- Oct^- Bnz^+
Pseudomonas chlororaphis PCL1391 (pBS216)	Phn^+ Nah^+ Sal^+ $Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Amp^r Nal^r Bzp^r Cef^r Cla^r Tol^- Mna^+ $Benz^+$ Hna^+ Xyl^- Oct^- Bnz^+
Pseudomonas chlororaphis PCL1391 (pOV17)	Phn^+ Nah^+ Sal^+ $Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Amp^r Nal^r Bzp^r Cef^r Cla^r Tol^- Mna^+ $Benz^+$ Hna^+ Xyl^- Oct^- Bnz^+
Pseudomonas aureofaciens BS1393	$Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Phn^- Nah^- Sal^- Mna^- $Benz^-$ Bnz^- Hna^- Xyl^- Oct^- Amp^r Nal^r Rif^r
Pseudomonas aureofaciens BS1393 (pNF142::Tn*Mod*-OTc)	Phn^+ Nah^+ Tc^r Sal^+ $Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Tol^- Mna^+ $Benz^+$ Hna^+ Xyl^- Oct^- Bnz^+ Amp^r Nal^r Rif^r
Pseudomonas aureofaciens BS1393 (pBS216)	Phn^+ Nah^+ Sal^+ $Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Tol^- Mna^+ Hna^+ Xyl^- Oct^- Bnz^+ $Benz^+$ Amp^r Nal^r Rif^r
Pseudomonas aureofaciens BS1393 (pOV17)	Phn^+ Nah^+ Sal^+ $Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Tol^- Mna^+ $Benz^+$ Hna^+ Xyl^- Oct^- Bnz^+ Amp^r Nal^r Rif^r

Способность к росту на: Phn^+ - фенантрене, Nah^+ - нафталине, Sal^+ - салицилате, Dsf^+ - дизельном топливе, $Npht^+$ - нефти, Hde^+ - гексадекане, Gnt^+ – гентизиновой кислоте, Sal^+- салицилате, Cam^+- камфоре, Hna^+- 1-гидрокси-2-нафтоате, Tol^+ - толуоле, Xyl^+ - ксилоле, Mna^+ - 2-метилнафталине, Oct^+- октане, Dec^+- декане, Non^+ - нонане, $Benz^+$ - бензоате; Bnz^+ - бензоле; $Ebnz^+$ - этилбензоле; Gfp^+ – наличие зеленого флюоресцирующего белка; Cys^- – ауксотрофность по цистеину; резистентность к антибиотикам: Cef^r– цефазолину, Bzp^r – бензилпенициллину, Nb^r – новобиоцину, Tc^r – тетрациклину, Rif^r – рифампицину, Tp^r – триметаприму, Sm^r- стрептомицину, Amp^r –ампициллину, Cla^r – клафорану, Km^r – канамицину, Gm^r – гентамицину, Nal^r – налидиксовой кислоте.

Чтобы оценить вклад плазмид в деградацию углеводородов были поставлены эксперименты по культивированию штаммов-деструкторов в жидкой минеральной

среде Эванса с нефтью в качестве единственного источника углерода и энергии. В процессе исследования оценивали прирост биомассы плазмидосодержащих и бесплазмидного штаммов в течение 10 суток культивирования (Рис.17). Кроме того, в данном эксперименте, в условиях периодического культивирования, проводилась оценка скоростей роста микроорганизмов в жидкой минимальной среде с нефтью. Максимальные удельные скорости роста на нефти у плазмидосодержащих штаммов *Pseudomonas chlororaphis* PCL 1391(pOV17) (0,052 $ч^{-1}$) и PCL1391(pBS216) (0,028 $ч^{-1}$) были больше, чем у бесплазмидного штамма PCL1391 (0,012 $ч^{-1}$). Наличие плазмид в штамме *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 приводило к увеличению численности клеток и максимальной удельной скорости роста на нефти по сравнению с бесплазмидным штаммом, однако прирост биомассы и максимальная удельная скорость зависели от используемой плазмиды.

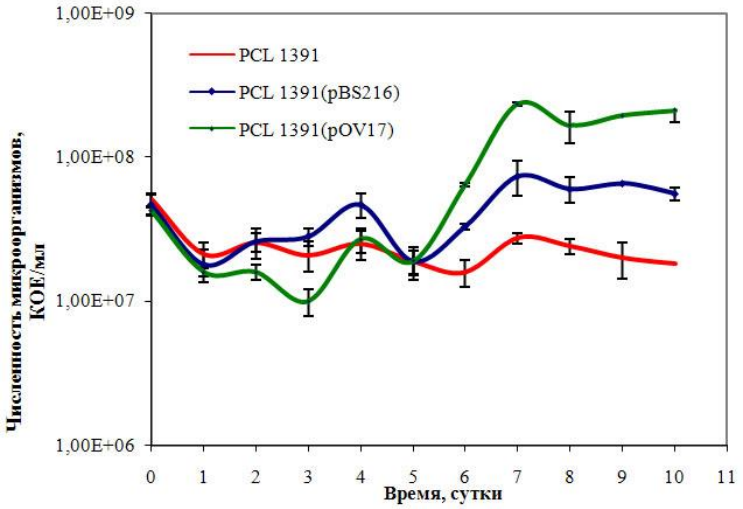


Рис. 17 Кривые роста бесплазмидного штамма и его плазмидосодержащих вариантов в жидкой минеральной среде с 2% нефти в течение 10 суток

Деградацию нефти исследованными штаммами оценивали по суммарному показателю её убыли в жидкой среде, определяемому весовым методом (гравиметрия). Наличие плазмид в штамме увеличивало степень деструкции нефти по сравнению с бесплазмидными штаммами, степень деструкции также зависела от плазмиды и используемого бесплазмидного штамма. Как видно из данных рисунка 18, наличие плазмиды pBS216 в штамме *P. chlororaphis* PCL1391 приводило к существенному увеличению (в 10 раз) степени деструкции нефти по сравнению с бесплазмидным штаммом, в то время как наличие плазмид pOV17 и pNF142::Tn*Mod*-OTc в этом же штамме не оказывало такого значительного эффекта. Присутствие этой

же плазмиды pBS216 в штаммах *P. aureofacies* BS1393 и *P. putida* BS394 увеличивало степень деструкции, но не так существенно.

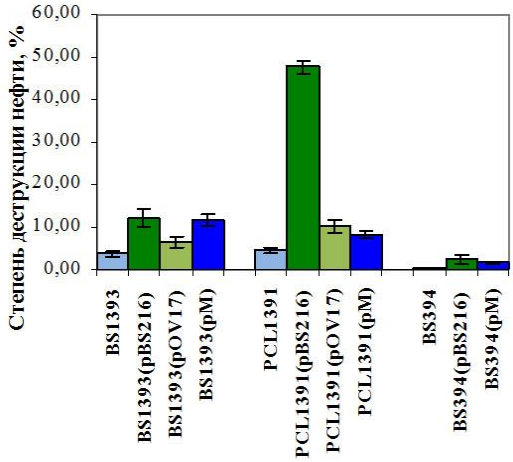


Рис. 18 Степень деструкции нефти плазмидосодержащими и бесплазмидными штаммами псевдомонад за 7 суток роста при 24 ºС (исходная концентрация нефти 16,8г/л – 2% по объему; плазмида pNF142::TnMod-OTc обозначена как pM)

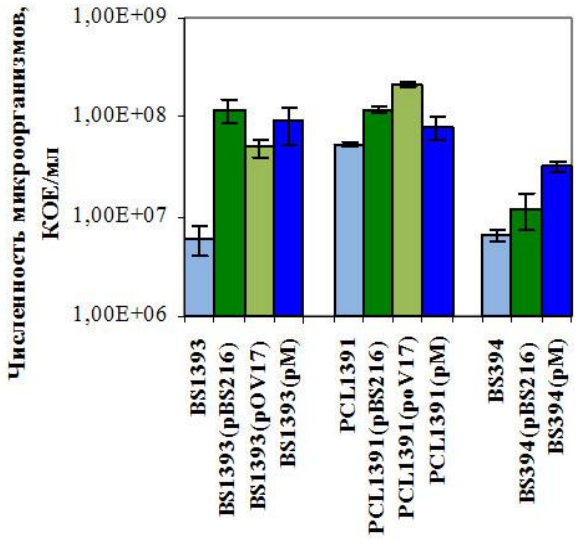


Рис. 19 Численность плазмидосодержащих и бесплазмидных штаммов в среде с нефтью после 7 суток культивирования при 24ºС(

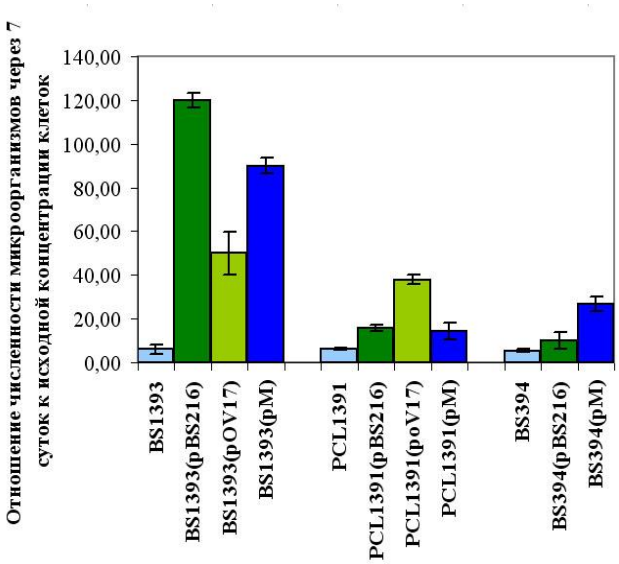


Рис. 20 Отношение конечной численности микроорганизмов к исходной концентрации клеток через 7 суток.

(*плазмида pNF142::TnMod-OTc обозначена как pM)*

Как видно из данных рисунка 19, во всех группах штаммов-хозяев плазмидосодержащие бактерии имели более высокие показатели КОЕ при росте на

нефти по сравнению с бесплазмидными. Следует отметить, что перенос плазмид биодеградации в штамм *P. chlororaphis* PCL1391 не вызывал значительного увеличения численности микроорганизмов при росте на нефти. Увеличение численности клеток плазмидосодержащих штаммов при культивировании на нефти наблюдалось для *P. aureofaciens* BS1393 и *P. putida* BS394. Следует отметить, что наибольший прирост биомассы наблюдался для штаммов BS1393 (pBS216) и BS1391(pOV17) по сравнению с бесплазмидными вариантами. Перенос плазмид pNF142::Tn*Mod*-OTc, pBS216, pOV17 в штамм *P. aureofaciens* BS1393 приводил к значительному (на порядок) увеличению максимальных значений КОЕ по сравнению с бесплазмидным штаммом (Рис. 19). Кроме того, наблюдался прирост биомассы клеток плазмидосодержащих микроорганизмов относительно бесплазмидных вариантов по сравнению с исходной концентрацией клеток (Рис. 20).

Таким образом, из всех исследуемых бактерий наибольшую степень деструкции нефти демонстрировал штамм *P. chlororaphis* PCL1391, содержащий плазмиду pBS216, причём численность данного штамма (КОЕ max) ($1{,}4\times10^8$ КОЕ/мл) (Рис. 19) и прирост его биомассы (Рис. 20) были не самыми высокими в данном эксперименте.

Для наиболее активных штаммов-деструкторов была проведена оценка фракционного состава остаточной нефти после 7 суток культивирования при 24ºС методом жидкостно-адсорбционной хроматографии (Табл.22).

Табл. 22. Изменение фракционного состава нефти после ее деградации плазмидосодержащими и бесплазмидными микроорганизмами.

Штамм	Остаточное содержание фракций нефти в пробах после деструкции, %			Убыль фракций нефти относительно содержания в контроле, %		
	Гексановая фракция, %	Бензольная фракция, %	Бензольно-спиртовая фракция, %	Гексановая фракция, %	Бензольная фракция, %	Бензольно-спиртовая фракция, %
P. chlororaphis PCL1391	56	19	10	**7**	**5**	**9**
P. chlororaphis PCL1391(pBS216)	26	9	5	38	31	26
P. chlororaphis PCL1391 *(* pNF142::Tn*Mod*-OTc *)*	52	19	10	13	5	9
P.chlororaphis PCL1391(pOV17)	56	17	9	7	15	18
Контроль (нефть без микроорганизмов)	60	20	11	0	0	0

Серым цветом выделены наилучшие показатели

Анализ данных, полученных для бесплазмидного штамма *P. chlororaphis* PCL1391, показал наибольшую убыль бензольно-спиртовой фракции нефти, которая составила 9% относительно содержания в контроле. Присутствие плазмиды pBS216 в штамме *P. chlororaphis* PCL1391 привело к увеличению деструкции парафинонафтеновых (гексановая фракция), моно- и полиароматических углеводородов (бензольная фракция), асфальтенов и смол (спирто-бензольная фракция). Так убыль трех фракций составила 38%, 31% и 26%, соответственно, что обусловило наивысшую степень деструкции нефти (47,7%). Присутствие плазмиды pOV17 в штамме привело к увеличению убыли бензольно-спиртовой (18%) и бензольной (15%) фракций нефти, а плазмиды pNF142::*TnMod*-OTc - к увеличению убыли гексановой фракции (13%).

3.2.2. Биодеструкция нефти бесплазмидными бактериями и плазмидосодержащими штаммами-деструкторами моноциклических ароматических углеводородов в жидкой минеральной среде

32 микроорганизма-деструктора моноциклических ароматических углеводородов рода *Pseudomonas*, выделенных из почв, загрязненных нефтепродуктами, были проверены на способность утилизировать толуол в качестве единственного источника углерода и энергии. В результате работы было отобрано 5 наиболее активных штаммов псевдомонад (24, 27, 31, 32, 33) (Табл. 23). Все использованные в работе штаммы рода *Pseudomonas* были способны к росту на нефти,

дизельном топливе, гексадекане и толуоле. Только штамм *Pseudomonas* sp. 24 был способен к утилизации нафталина. Способность к росту на этилбензоле отмечена для двух штаммов *Pseudomonas* sp. 31 и *Pseudomonas* sp. 32. Использовали бензол в качестве источника углерода и энергии штаммы *Pseudomonas* sp. 27, *Pseudomonas* sp. 31 и *Pseudomonas* sp. 32.

Табл. 23. Характеристика штаммов, использованных в работе.

Штамм	Характеристика штамма
Pseudomonas sp. 24	$Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Tol^+ Xyl^- Nah^+ Phn^- $Ebnz^-$ Bnz^- $Benz^+$
Pseudomonas sp. 27	$Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Tol^+ Xyl^- Nah^- Phn^- $Ebnz^-$ Bnz^+ $Benz^-$
Pseudomonas sp. 31	$Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Tol^+ Xyl^- Nah^- Phn^- $Ebnz^+$ Bnz^+ $Benz^+$
Pseudomonas sp. 32	$Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Tol^+ Xyl^- Nah^- Phn^- $Ebnz^+$ Bnz^+ $Benz^+$
Pseudomonas sp. 33	$Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Tol^+ Xyl^- Nah^- Phn^- $Ebnz^-$ Bnz^- $Benz^+$

Способность к росту на: $Npht^+$ - нефти, Dsf^+ - дизельном топливе, Hde^+ - гексадекане, Tol^+ - толуоле, Xyl^+ - ксилоле, Nah^+ - нафталине, Phn^+ - фенантрене, $Ebnz^+$ - этилбензоле, Bnz^+ - бензоле, $Benz^+$ - бензоате

Далее был проведен анализ плазмидных генов. ПЦР является одним из наиболее быстрых, специфичных и чувствительных методов, позволяющих выявить наличие определенных последовательностей в различных микроорганизмах. Для изучения генетического контроля биодеструкции толуола была проведена ПЦР с праймерами, специфичными для генов, кодирующих толуол диоксигеназу, катехол 2,3-диоксигеназу, а также с праймерами, специфичными для *ori-rep* области плазмид IncP-9 группы несовместимости (Рис. 21, Рис. 22, Рис. 23). С разработкой праймеров для детекции плазмид IncP-9 группы стало возможным молекулярно-биологическое тестирование плазмид на принадлежность к данной группе несовместимости с использованием ПЦР – анализа. В работе использовался праймер, специфичный для гена *repAB* репликона IncP-9 (Krasowiak et.al., 2002). Данные электрофореграммы (Рис. 23) указывают на то, что продукта амплификации с праймерами, специфичными для *ori-rep* Inc P-9, не было получено для исследованных микроорганизмов. Данный результат может свидетельствовать о наличии в исследуемых штаммах плазмид, не относящихся к Inc P-9 группе несовместимости.

Анализ электрофореграммы продуктов ПЦР с праймерами, специфичными для гена, кодирующего толуол диоксигеназу, показал наличие этого гена во всех штаммах (Рис. 21). Из данных рисунка 13 следует, что ген *c23o*, кодирующий катехол-2,3-

диоксигеназу, присутствует в плазмидных препаратах штаммов *Pseudomonas spp.* 24 и 27. С использованием праймера специфичного для гена, кодирующего 3-метилкатехол-2,3-диоксигеназу, определили наличие гена *tod*E во всех исследуемых штаммах.

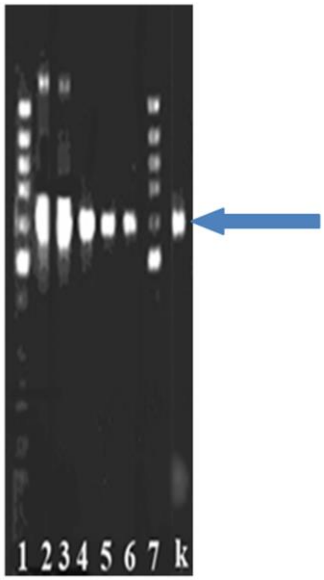


Рис. 21 Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами, специфичными для гена, кодирующего толуол диоксигеназу (todC1) у штаммов-деструкторов толуола.

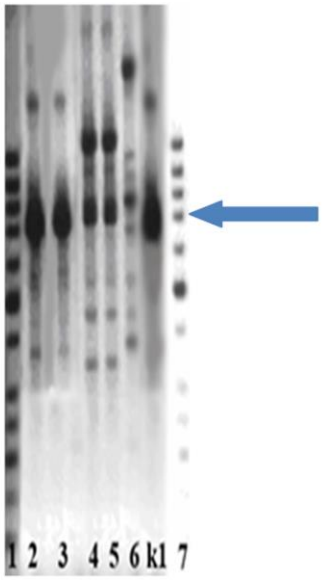


Рис. 22 Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами, специфичными для гена кодирующего катехол-2,3-диоксигеназу (c23o) у штаммов-деструкторов толуола.

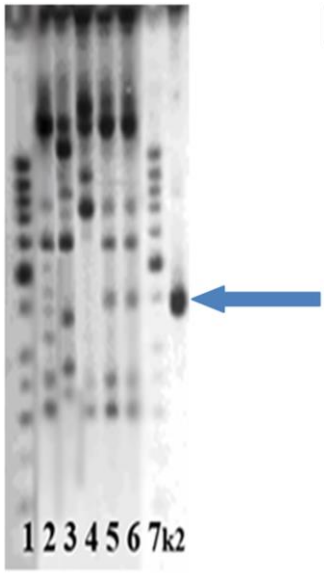


Рис. 23 *Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами, специфичными для ori-rep области плазмид IncP-9 группы несовместимости.*

Условные обозначения: **1,7**-1 т.п.н. ДНК маркер; **2**-*Pseudomonas sp.*24(p24); **3**- *Pseudomonas sp.*27(p27); **4**-*Pseudomonas sp.*31(p31); **5**- *Pseudomonas sp.*32(p32); **6**- *Pseudomonas sp.*33(p33); **k**-*Pseudomonas putida* F1 (*todC1*); **k1**- *Pseudomonas putida* F1 (*c23o*); **k2**- *Pseudomonas putida* mt-2 (*repAB*).

Для определения плазмидной локализации генов биодеградации толуола и конъюгативности несущих их плазмид были поставлены скрещивания, в которых в качестве доноров использовали аборигенные деструкторы толуола (24, 27, 31, 32, 33), а реципиентом был бесплазмидный штамм *Pseudomonas putida* КТ2442. Селекцию вели по толуолу, а контрселекция осуществлялась по канамицину. Трансконъюганты

были получены только в скрещиваниях со штаммами *Pseudomonas spp.* 24, 32, 33. Их характеристика приведена в таблице 24. Полученные плазмидосодержащие штаммы КТ2442, имеющие в составе хромосомы *gfp* ген, легко обнаруживались путем высева на агаризованную среду ЛБ: колонии давали характерное зеленое свечение в ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм), обусловленное наличием в клетке флюоресцирующего белка. Кроме того, они обладали хромосомными генами резистентности к рифампицину и канамицину. Частота переноса составила 3×10^{-7} на клетку донора. Для подтверждения полученных результатов были поставлены эксперименты по визуализации плазмидной ДНК методом Экхарда (Рис.24). Данные рисунка 15 свидетельствует о наличии идентичных по размеру плазмид как в аборигенных микроорганизмах, так и в полученных трансконъюгантах.

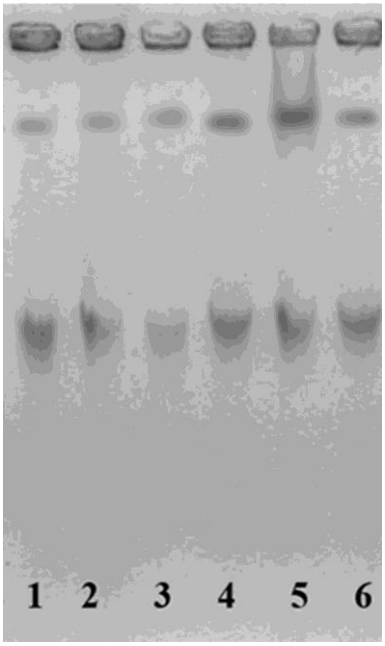


*Рис. 24 Электрофореграмма плазмидных ДНК штаммов-деструкторов толуола: 1 – Pseudomonas sp.*24(p24); 2 – *Pseudomonas putida* KT2442(p24); 3 – *Pseudomonas sp.*32(p32); 4 – *Pseudomonas putida* KT2442(p32); 5 – *Pseudomonas* sp.33(p33); 6 – *Pseudomonas putida* KT2442(p33).

Табл. 24. Характеристика трансконъюгантных штаммов.

Штамм	Характеристика штамма
Pseudomonas putida KT2442	Gfp^+ $Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Tol^- Xyl^- Nah^- Phn^- $Ebnz^-$ Bnz^- $Benz^+$
Pseudomonas putida KT2442 (p24)	Gfp^+ $Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Tol^+ Xyl^- Nah^- Phn^- $Ebnz^-$ Bnz^- $Benz^+$
Pseudomonas putida KT2442 (p32)	Gfp^+ $Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Tol^+ Xyl^- Nah^- Phn^- $Ebnz^+$ Bnz^+ $Benz^+$
Pseudomonas putida KT2442 (p33)	Gfp^+ $Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Tol^+ Xyl^- Nah^- Phn^- $Ebnz^-$ Bnz^- $Benz^+$

Способность к росту на: $Npht^+$ - нефти, Dsf^+ - дизельном топливе, Hde^+ - гексадекане, Tol^+ - толуоле, Xyl^+ - ксилоле, Nah^+ - нафталине, Phn^+ - фенантрене, $Ebnz^+$ - этилбензоле, Bnz^+ - бензоле, $Benz^+$ - бензоате, Gfp^+ – наличие зеленого флюоресцирующего белка

Способность полученных трансконъюгантов расти на толуоле свидетельствует о плазмидной локализации генов, кодирующих деградацию толуола. Штамм *Pseudomonas putida* KT2442 (p32) рос на бензоле и этилбензоле, как и аборигенный донорный микроорганизм *Pseudomonas sp.* 32, что, возможно, также обусловлено плазмидной локализацией генов, кодирующих ферменты деградации этих соединений (Табл. 16). Все исследуемые трансконъюганты были резистентны к ампициллину, канамицину, рифампицину, цефазолину, бензапенициллину. Бесплазмидный штамм *Pseudomonas putida* KT2442 устойчив к следующим антибиотикам: канамицин, рифампицин, налидиксовая кислота, ампициллин. Резистентность к цефазолину и бензилпенициллину у полученных трансконъюгантов, по-видимому, детерминирована наличием плазмидных генов устойчивости к данным антибиотикам.

Для оценки роли плазмид биодеградации толуола в деградации нефти проводили культивирование на нефти бесплазмидного штамма *Pseudomonas putida* KT2442, его трансконъюгантов, содержащих плазмиды p24, p32 и p33, а также природных штаммов-хозяев этих плазмид. Исследование степени деструкции нефти в жидкой минеральной среде показало, что плазмидосодержащие аборигенные и трансконъюгантные микроорганизмы имели больший показатель степени деструкции по сравнению с бесплазмидным штаммом *Pseudomonas putida* KT2442 (Рис.25). Однако хозяйское окружение влияло на экспрессию плазмидных генов, что

проявилось в уменьшении степени деструкции нефти трансконъюгантными штаммами *Pseudomonas putida* КТ2442 (р32) и *Pseudomonas putida* КТ2442 (р33) по сравнению с природными штаммами-хозяевами плазмид.

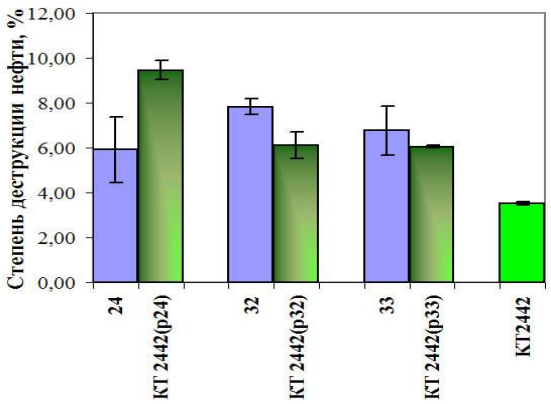


Рис. 25 Степень деструкции нефти штаммами – природными хозяевами плазмид, трансконъюгантными и реципиентным бесплазмидным штаммом КТ2442 за 7 суток роста при 24°С (исходная концентрация нефти 16,8г/л – 2% по объему).

В процессе исследования также оценивали численность плазмидосодержащих (аборигенных и трансконъюгантных микроорганизмов) и бесплазмидного штамма *Pseudomonas putida* КТ2442, а именно число колониеобразующих единиц (КОЕ) после 7 суток культивирования в минеральной среде с нефтью в качестве единственного источника углерода и энергии (Рис.26). Как видно из данных рисунков 26 и 27, во всех случаях плазмидосодержащие бактерии имели более высокие показатели КОЕ при росте на нефти по сравнению с бесплазмидным реципиентом *P. putida* КТ2442. Однако, только для трансконъюганта *P. putida* КТ2442 (р32) была отмечена более высокая численность клеток по сравнению с природным штаммом-хозяином плазмиды р32 при культивировании в среде с нефтью.

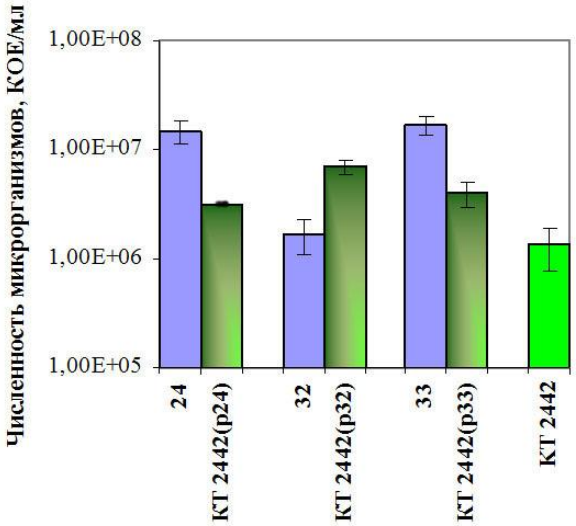


Рис. 26 Численность плазмидосодержащих (аборигенных и трансконъюгантных микроорганизмов) и бесплазмидного штамма Pseudomonas putida KT2442 в среде с нефтью после 7 суток культивирования при 24ºС.

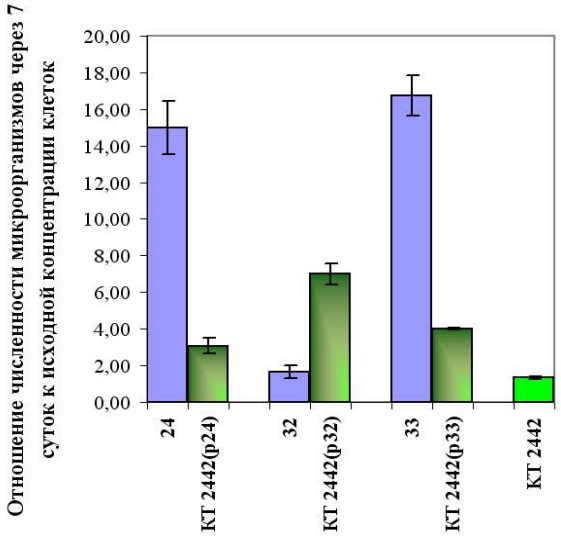


Рис. 27 Отношение численности микроорганизмов через 7 суток к исходной концентрации клеток.

Из всех полученных трансконъюгантов только штамм *P. putida* KT2442 (p24) оказался более эффективным деструктором нефти по сравнению с аборигенным хозяином плазмиды *Pseudomonas sp*. 24 (Табл. 24). Следует отметить, что численность данного микроорганизма не была самой высокой в этом эксперименте и составила $3{,}07\times10^6$ КОЕ/мл.

Чтобы оценить роль плазмид в деструкции отдельных фракций нефти, было проведено фракционирование остаточной нефти в микроколонках с оксидом алюминия после культивирования микроорганизмов (Табл. 25). Присутствие плазмид в штамме *P. putida* KT2442 привело к увеличению деструкции ароматических углеводородов бензольной фракции на 5-8% по сравнению с бесплазмидным штаммом. Убыль спирто-бензольной фракции, содержащей смолы и асфальтены, для штамма *Pseudomonas putida* KT2442 содержащего плазмиду p33 составила 44%, плазмиду p32 -12%, плазмиду p24 - 13% относительно содержания в контроле.

Табл. 25. Изменение фракционного состава нефти после ее деградации плазмидосодержащими и бесплазмидными микроорганизмами.

Штамм	Остаточное содержание фракций нефти в пробах после деструкции, %			Убыль фракций нефти относительно содержания в контроле, %		
	Гексановая фракция, %	Бензольная фракция, %	Бензольно-спиртовая фракция, %	Гексановая фракция, %	Бензольная фракция, %	Бензольно-спиртовая фракция, %
Pseudomonas putida KT2442 (p24)	54	14	13	6	19	13
Pseudomonas sp. 24(p24)	58	17	13	4	5	10
Pseudomonas putida KT2442 (p32)	59	13	15	2	16	12
Pseudomonas sp. 32(p32)	56	16	14	8	10	8
Pseudomonas putida KT2442 (p33)	62	15	8	н/о	16	44
Pseudomonas sp. 33(p33)	55	15	13	8	16	14
Pseudomonas putida KT2442	58	16	15	4	11	0
Контроль (нефть без микроорганизмов)	60	18	15	0	0	0

3.2.3. Роль плазмид биодеградации нафталина, толуола и камфары в процессе биодеградация нефти в жидкой минеральной среде

В работе также использовали 3 природных штамма, содержащих плазмиды биодеградации: pWWO (толуола), CAM (камфары) и pBS1141 (нафталина) (Табл. 26). Штамм *Pseudomonas putida* mt-2 содержит плазмиду pWWO (115 т.п.н.), штамм *Pseudomonas putida* BS237 несет плазмиду CAM (500 т.п.н.). Штамм *Pseudomonas putida* BS3701 имеет 2 плазмиды pBS1141 (100 т.п.н.) и pBS1142 (50 т.п.н.). Гены биодеградации нафталина расположены на плазмиде pBS1141. Ранее было установлено, что плазмида pBS1142 не несет генов биодеградации (Патент РФ №2312891). В ходе работы были получены бесплазмидные варианты этих штаммов путем спонтанной элиминации плазмид при длительном культивировании в неселективных условиях (Табл.21). Для простоты, в дальнейшем изложении результатов элиминант BS3701E(pBS1142) будет обозначен как BS3701E, а плазмидосодержащий штамм BS3701(pBS1141, pBS1142) – как BS3701.

Табл. 26. Характеристика природных плазмидосодержащих штаммов и их элиминантов.

Штамм	Характеристика штамма
Pseudomonas putida BS3701	$Npht^+$ $Dsf^+$$Hde^+$ $Nah^+$$Sal^+$ Phn^+ Tol^+ Cam^+ Xyl^-
Pseudomonas putida BS3701E	$Npht^+$ $Dsf^+$$Hde^+$ $Nah^-$$Sal^+$ Phn^- Tol^- Cam^- Xyl^-
Pseudomonas putida BS237	$Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Nah^- Sal^- Phn^- Tol^- Cam^+ Xyl^-
Pseudomonas putida BS237E	$Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Nah^- Sal^- Phn^- Tol^- Cam^- Xyl^-
Pseudomonas putida mt-2	$Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Nah^- Sal^- Phn^- Tol^+ Cam^- Xyl^-
Pseudomonas putida mt-2E	$Npht^+$ Dsf^+ Hde^+ Nah^- Sal^- Phn^- Tol^- Cam^- Xyl^-

Способность к росту на: $Npht^+$ - нефти, Dsf^+ - дизельном топливе, Hde^+ - гексадекане, Nah^+ - нафталине, Sal^+ - салицилате, Phn^+ - фенантрене, Tol^+ - толуоле, Cam^+- камфоре, Xyl^+ - ксилоле

Для этих микроорганизмов были определены спектр утилизируемых субстратов (Табл. 26), степень деструкции нефти (Рис. 28) и ростовые характеристики бактерий (Рис.29 и Рис.30).

Исследуемые штаммы различались по способности к деструкции нефти в жидкой минеральной среде. Из данных рисунка 28 видно, что наличие плазмиды pBS1141 в штамме *P. putida* BS3701 приводило к существенному увеличению (почти в 4 раза) степени деструкции нефти по сравнению со штаммом BS3701E. Результаты, полученные в ходе эксперимента, свидетельствуют, что наличие плазмид CAM и pWWO в штаммах микроорганизмов *P. putida* BS237 и *P. putida* mt-2 соответственно, увеличивает степень деструкции нефти в 1,5-2 раза.

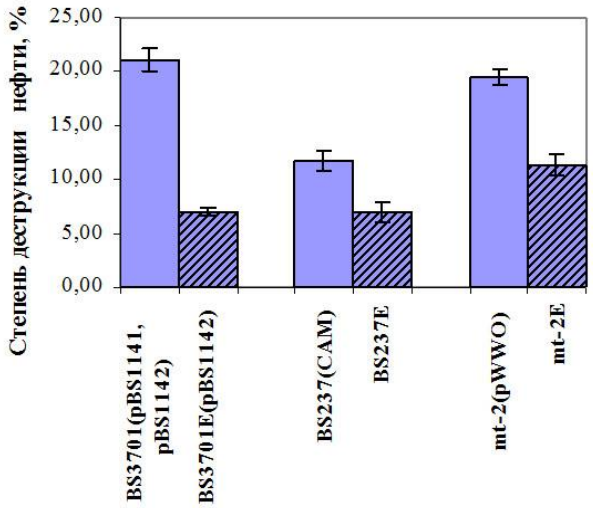


Рис. 28 Степень деструкции нефти природными плазмидосодержащими штаммами и их элиминантами за 7 суток роста при 24° С. (Исходная концентрация нефти 16,8г/л – 2% по объему).

В процессе исследования оценивали ростовые характеристики плазмидосодержащих и бесплазмидных штаммов, а именно, число колониеобразующих единиц (КОЕ) и отношение численности микроорганизмов через 7 суток к исходной концентрации клеток в минеральной среде с нефтью в качестве единственного источника углерода и энергии. Как видно из данных рисунков 29 и 30, плазмидосодержащие бактерии имели более высокие показатели КОЕ и степени увеличения численности микроорганизмов относительно исходной концентрации клеток при росте на нефти по сравнению с бесплазмидными.

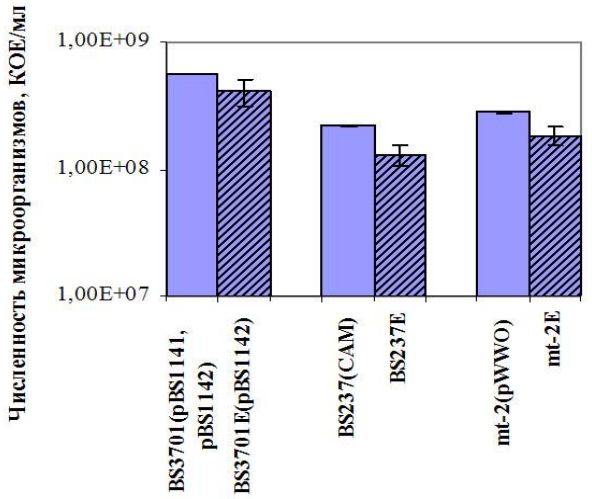


Рис. 29 Численность плазмидосодержащих и бесплазмидных штаммов Pseudomonas в среде с нефтью после 7 суток культивирования при 24°С.

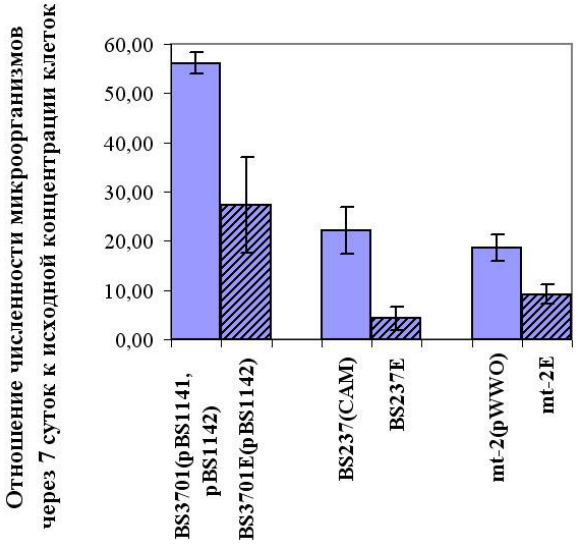


Рис. 30 Отношение численности микроорганизмов через 7 суток к исходной концентрации клеток.

Наибольшая деструкция парафинонафтеновых, моно- и полиароматических углеводородов, асфальтенов и смол (табл. 27) обнаружена после культивирования штамма *P. putida* BS3701, где степень деградации трех фракций составили 24%, 35% и 30% соответственно, что обусловило наивысшую степень деструкции нефти (22% см. Рис. 28), полученную в данном эксперименте. Наличие плазмиды биодеградации нафталина pBS1141 в штамме *P. putida* BS3701 приводило к увеличению убыли бензольной фракции на 10%, а гексановой - на 13% по сравнению со штаммом, не содержащем данной плазмиды. Штамм *P. putida* BS237 в большей степени деградировал углеводороды бензольной (27%) и бензольно-спиртовой (22%) фракций нефти. Плазмида CAM вносит вклад в убыль бензольной фракции на 3%, гексановой и бензольно-спиртовой фракций - на 2%. Для штамма *P. putida* mt-2(pWWO) отмечена практически одинаковая способность к деградации гексановой (22%) и бензольно-спиртовой (23%) фракций, но в то же время убыль бензольной фракции составила 27% относительно содержания в контроле. Вклад плазмиды pWWO заметен во всех трех фракциях нефти: так вклад в убыль бензольной фракции составил 4%,гексановой - 6%, а бензольно-спиртовой -5%.

Табл.27. Изменение фракционного состава нефти после ее разложения микроорганизмами.

Штамм	Остаточное содержание фракций нефти в пробах после деструкции, %			Убыль фракций нефти относительно содержания в контроле, %		
	Гексановая фракция, %	Бензольная фракция, %	Бензольно-спиртовая фракция, %	Гексановая фракция, %	Бензольная фракция, %	Бензольно-спиртовая фракция, %
***P. putida* BS3701 (pBS1141, pBS1142)**	53	12	9	**24**	**35**	30
***P. putida* BS3701E (pBS1142)**	61	14	9	**11**	**25**	**27**
***P. putida* BS237(CAM)**	59	14	10	14	**27**	22
***P. putida* BS237E**	61	15	10	12	**24**	20
***P. putida* mt-2(pWWO)**	54	14	10	**22**	**27**	**23**
***P. putida* mt-2E**	58	15	9	**16**	**23**	**18**
Контроль (нефть без микроорганизмов)	68	19	12	0	0	0

Таким образом, плазмида биодеградации нафталина pBS1141 вносит существенный вклад (10-12%) в деструкцию гексановой и бензольной фракции. Плазмида pWWO вносит небольшой вклад (4%) в убыль всех трех фракций. У плазмиды CAM отмечен наименьший вклад в убыль различных фракций нефти (2-3%).

Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что наличие плазмид в штаммах приводит к увеличению степени деструкции нефти по сравнению с бесплазмидными вариантами. Установлено, что плазмидосодержащие бактерии также имеют большую численность клеток при культивировании в жидкой минеральной среде с нефтью. Наилучшие показатели деградации нефти плазмидосодержащими бактериями в жидкой среде были выявлены для штаммов *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391(pOV17) и PCL1391(pBS216), а также для *Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142).

3.2.4. Роль плазмид биодеградации ПАУ в процессе биодеградация нефти в модельных почвенных системах

Для подтверждения преимущества плазмидосодержащих штаммов-деструкторов по сравнению с бесплазмидными в процессе деградации нефти были поставлены эксперименты в модельных почвенных системах по схеме (Рис. 31, Табл. 28). Микрокосмы инокулировали следующими штаммами микроорганизмов: BS3701(pBS1141, pBS1142), BS3701E(pBS1142) – элиминант, PCL1391 – бесплазмидный штамм, PCL1391(pOV17) и PCL1391(pBS216). Выбор данных микроорганизмов обусловлен результатами, полученными в ходе экспериментов по определению степени деструкции нефти в жидкой минеральной среде – выбраны наиболее показательные плазмидосодержащие и бесплазмидные штаммы рода *Pseudomonas.* В стерильных и нестерильных модельных почвенных системах было проведено сравнение эффективности деградации нефти интордуцированными бесплазмидными и плазмидосодержащими штаммами. Для оценки испарения и абиотической деградации нефти использовали стерильную почву (Табл. 28, микрокосм 1). Вклад аборигенных микроорганизмов в деградацию оценивали по убыли нефти в нестерильной почвенной системе (Табл. 28, микрокосм 2). Исследование популяционной динамики интродуцированных и аборигенных микроорганизмов проводили в микрокосмах 8–12. Исследование популяционной динамики интродуцированных бактерий в стерильной почве проводили в микрокосмах 3–7.

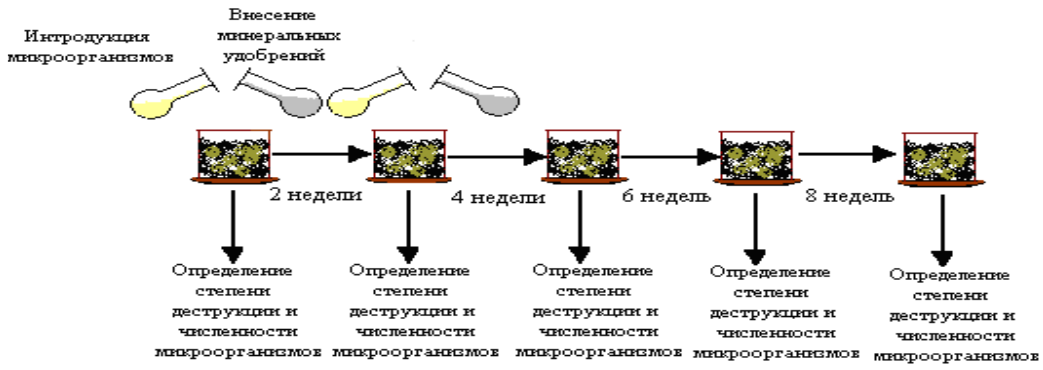


Рис. 31 Схема модельного стерильного и нестерильного почвенного эксперимента.

Табл. 28. Характеристика микрокосмов.

№ микрокосма	Эксперимент со стерильной почвой	№ микрокосма	Эксперимент с нестерильной почвой
1	контроль без микроорганизмов	2	контроль с аборигенными бактериями
3	PCL 1391	8	PCL 1391
4	PCL 1391(pOV17)	9	PCL 1391(pOV17)
5	PCL 1391(pBS216)	10	PCL 1391(pBS216)
6	BS3701E(pBS1142)	11	BS3701E(pBS1142)
7	BS3701(pBS1141, pBS1142)	12	BS3701(pBS1141, pBS1142)

Исследование динамики численности интродуцированных плазмидосодержащих и бесплазмидных штаммов в течение 8 недель эксперимента (Рис. 32, Табл.29) показало, что численность плазмидосодержащих штаммов была выше по сравнению с бесплазмидными .

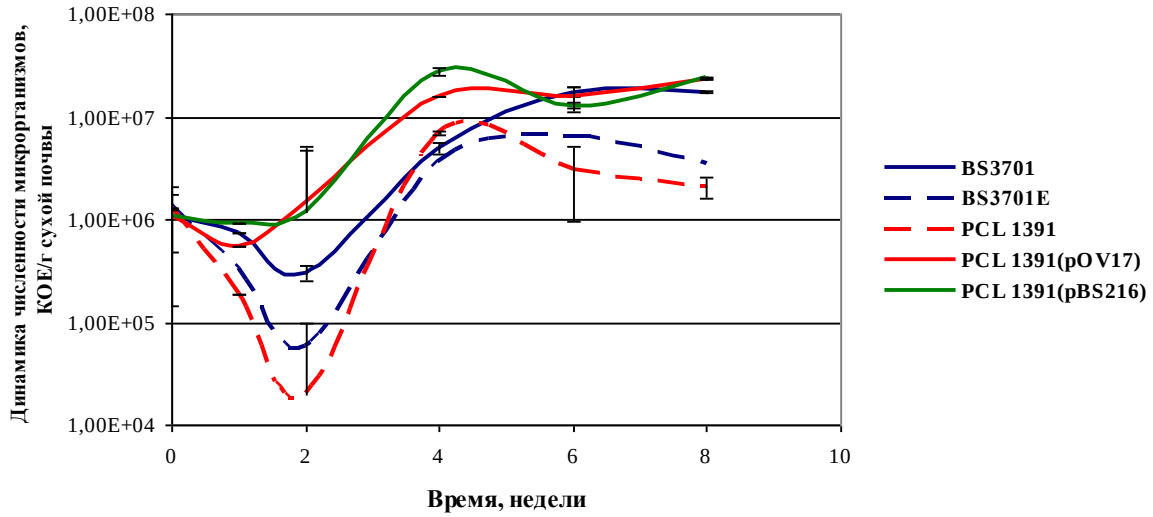


Рис. 32 Динамика роста интродуцированных микроорганизмов в нестерильной почве, загрязненной нефтью

Табл. 29. Численность интродуцированных микроорганизмов от общей численности гетеротрофов и нефтедеструкторов (аборигенных и интродуцированных) в конце эксперимента (через 8 недель) в нестерильной почвенной системе.

Штаммы	Численность, КОЕ/г сухой почвы		Содержание интродуцированных микроорганизмов, %	
	нефтедеструкторы	общее число гетеротрофов	от общего количества нефтедеструкторов	от общего числа гетеротрофов
BS3701E	**$2{,}77\times10^{6}$**$\pm3{,}21\times10^{5}$	$4{,}89\times10^{6}\pm2{,}11\times10^{5}$	**55,57**±2,14	31,51±4,80
BS3701	**$2{,}41\times10^{7}$**$\pm2{,}69\times10^{6}$	$3{,}51\times10^{7}\pm9{,}18\times10^{5}$	**63,78**±2,12	43,87±3,46
PCL 1391	**$5{,}12\times10^{6}$**$\pm4{,}15\times10^{5}$	$6{,}64\times10^{6}\pm4{,}22\times10^{5}$	**46,91**±1,17	36,16±1,94
PCL 1391(pOV17)	**$1{,}34\times10^{7}$**$\pm1{,}12\times10^{6}$	$2{,}20\times10^{7}\pm3{,}43\times10^{6}$	**80,48**±2,06	49,02±3,38
PCL 1391 (pBS216)	**$2{,}01\times10^{7}$**$\pm3{,}17\times10^{6}$	$2{,}30\times10^{7}\pm1{,}07\times10^{6}$	**66,45**±1,27	57,99±6,28

В модельных стерильных и нестерильных системах с интродуцированными плазмидосодержащими штаммами наблюдалось большее снижение концентрации нефти, чем в системах с бесплазмидными вариантами бактерий (Рис. 33 и Рис. 34).

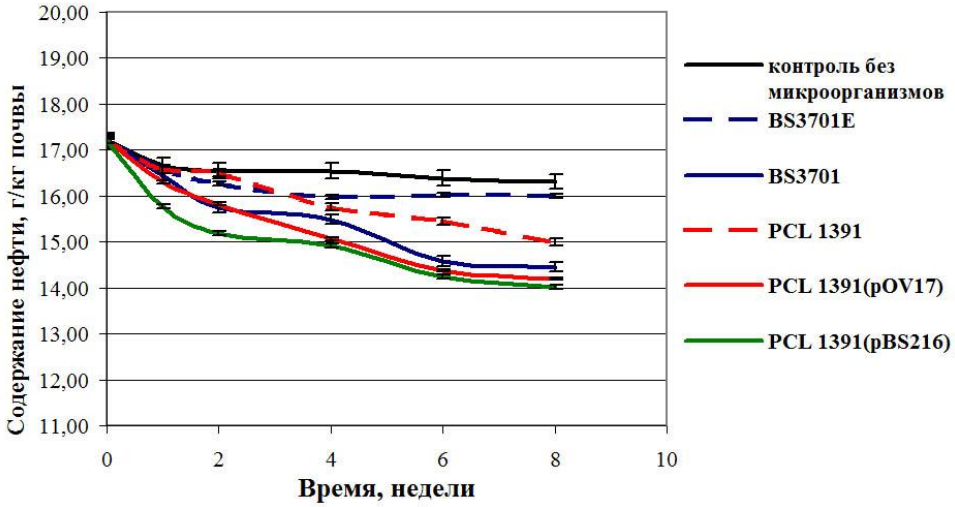


Рис. 33 Изменение содержания нефти в стерильной почве

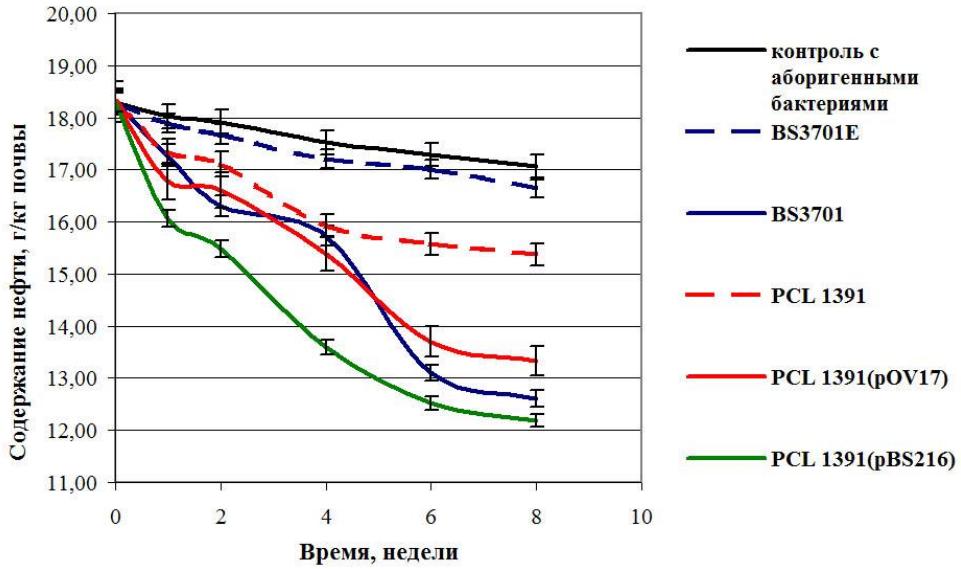


Рис. 34 Изменение содержания нефти в нестерильной почве

Как видно из данных рисунков 35А и Б, в процессе деградации нефти в модельных почвенных системах наблюдался значительный эффект при внесении плазмидосодержащих штаммов BS3701(pBS1141, pBS1142), PCL1391(pOV17), особенно выраженный в системах с нестерильной почвой.

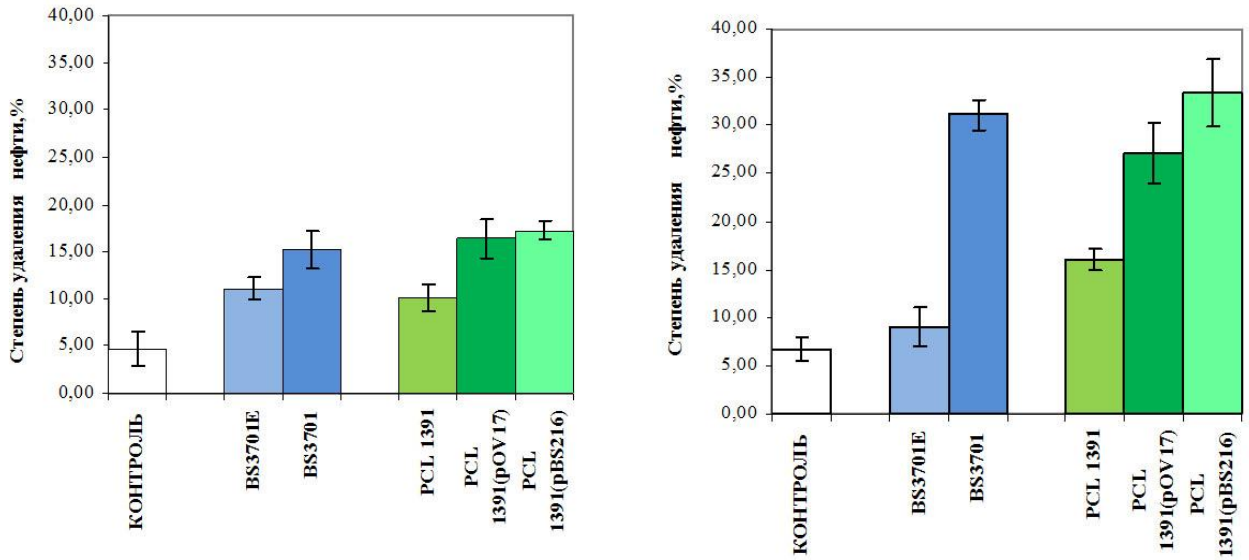


Рис. 35 Степень деструкции нефти в стерильной (А) и нестерильной (Б) почве через 8 недель.

Таким образом, в лабораторных условиях было показано, что использование штаммов микроорганизмов, содержащих плазмиды биодеградации ароматических соединений, в процессе очистки нефтезагрязненных модельных систем обеспечивает большую степень деструкции нефти по сравнению с использованием их бесплазмидных вариантов.

3.3 Роль горизонтального переноса катаболических плазмид в процессе биодеградации ПАУ

3.3.1 Конструирование маркированных штаммов-деструкторов *P. putida* KT2442(pNF142::TnMod-OTc) и *P. putida* BS394(pNF142::TnMod-OTc)

С целью получения маркированного штамма *P. putida* KT2442 (pNF142::TnMod-OTc) штамм *E. coli* S17-1 был трансформирован плазмидной ДНК pTnMod-OTc, содержащей мини-транспозон TnMod-OTc. С помощью конъюгационного переноса плазмиду pTnMod-OTc из штамма *E.coli* S17-1 перенесли в штамм *Pseudomonas fluorescens*142NF, содержащий плазмиду биодеградации нафталина pNF142. Мини-транспозон, содержащий ген резистентности к тетрациклину, был встроен в плазмиду pNF142 (Рис. 36). Полученный штамм *Pseudomonas fluorescens* 142NF Nah+ Tcr был использован в качестве донора в скрещиваниях с *P. putida* KT2442 gfp (селекция – Nah, Tc, контрселекция – Km). В результате было отобрано 8 трансконъюгантных клонов *P. putida* KT2442 с фенотипом Nah+ Tcr Kmr Gfp+, что свидетельствовало о встройке мини-транспозона TnMod-OTc в плазмиду pNF142.

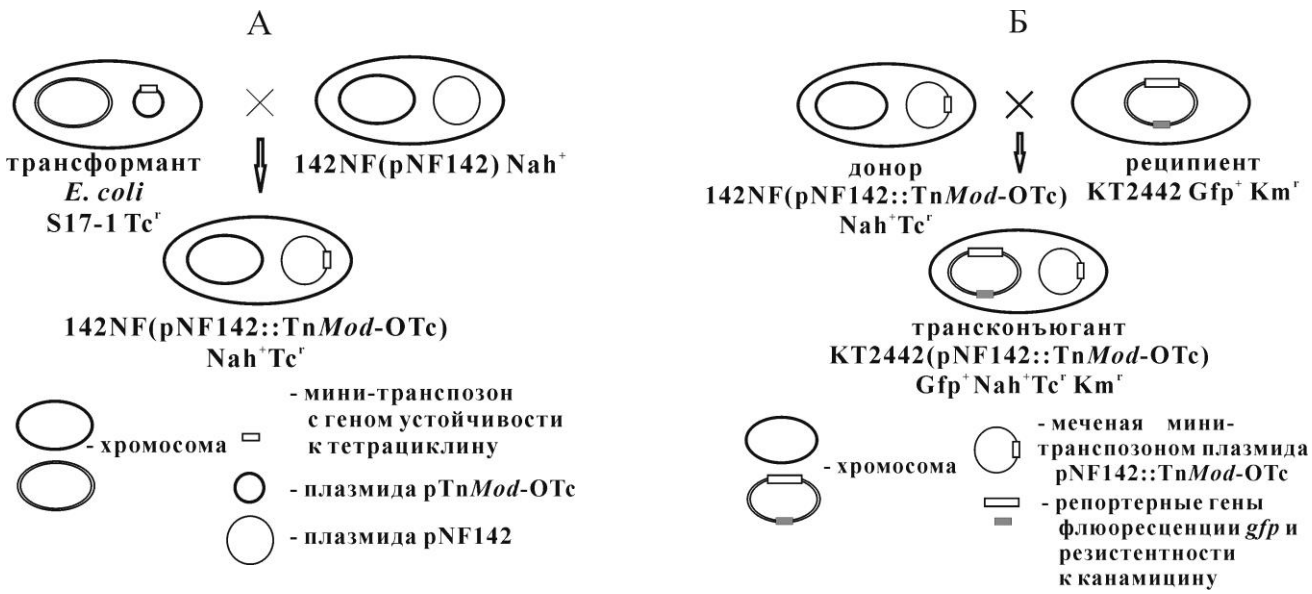


Рис. 36 Схемы конструирования плазмиды биодеградации нафталина pNF142, меченной мини-транспозоном TnMod-OTc (А) и получения маркированного штамма P. putida KT2442(pNF142::TnMod-OTc) (Б)

Два из них, – клоны 5 и 8, были использованы для дальнейшей работы. Маркированный штамм, имеющий в составе хромосомы *gfp* ген, легко обнаруживался путем высева на агаризованную среду LB: колонии давали характерное зеленое свечение в ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм), обусловленное флюоресцирующим белком. Кроме того, он обладал хромосомными генами резистентности к рифампицину и канамицину.

Плазмиду pNF142::TnMod-OTc из штамма *P. putida* KT2442(pNF142::TnMod-OTc) перенесли путем конъюгационного переноса в ауксотрофный штамм *P. putida* BS394, после чего он приобрел способность к росту на нафталине и резистентность к тетрациклину.

Сконструированные штаммы *P. putida* BS394(pNF142::TnMod-OTc) и KT2442pNF142::TnMod-OTc) стабильно сохраняли способность к росту на нафталине, 2-метилнафталине и салицилате и не теряли устойчивость к тетрациклину после 10 ежедневных последовательных пересевов в неселективных условиях в жидкой среде LB.

3.3.2. Определение удельной скорости роста штаммов-деструкторов на нафталине

В работе сравнивали максимальную удельную скорость роста на нафталине в жидкой минеральной среде природных штаммов *Pseudomonas* sp. 142NF(pNF142) и *P. putida* G7(NAH7) и сконструированных трансконъюгантных штаммов *P. putida* BS394(pNF142::TnMod-OTc), KT2442(pNF142::TnMod-OTc) (клоны 5 и 8) и KT2442, содержащего плазмиду биодеградации нафталина pBS216. Как видно из данных рисунка 37, сконструированные штаммы BS394(pNF142::TnMod-OTc) и *P. putida* KT2442(pNF142::TnMod-OTc)клон 8 имели значения μmax, близкие к максимальной удельной скорости роста природного изолята – штамма *Pseudomonas* sp. 142NF(pNF142).

Максимальная удельная скорость роста трансконьюгантного штамма *P. putida* KT2442(pNF142::TnMod-OTc) клон 5 (μmax =0,75 $ч^{-1}$) почти в два раза превышала таковую природного штамма *Pseudomonas* sp. 142NF(pNF142) (μmax = 0,46 ч-1). В дальнейшей работе был использован штамм *P. putida* KT2442(pNF142::TnMod-OTc) клон 5.

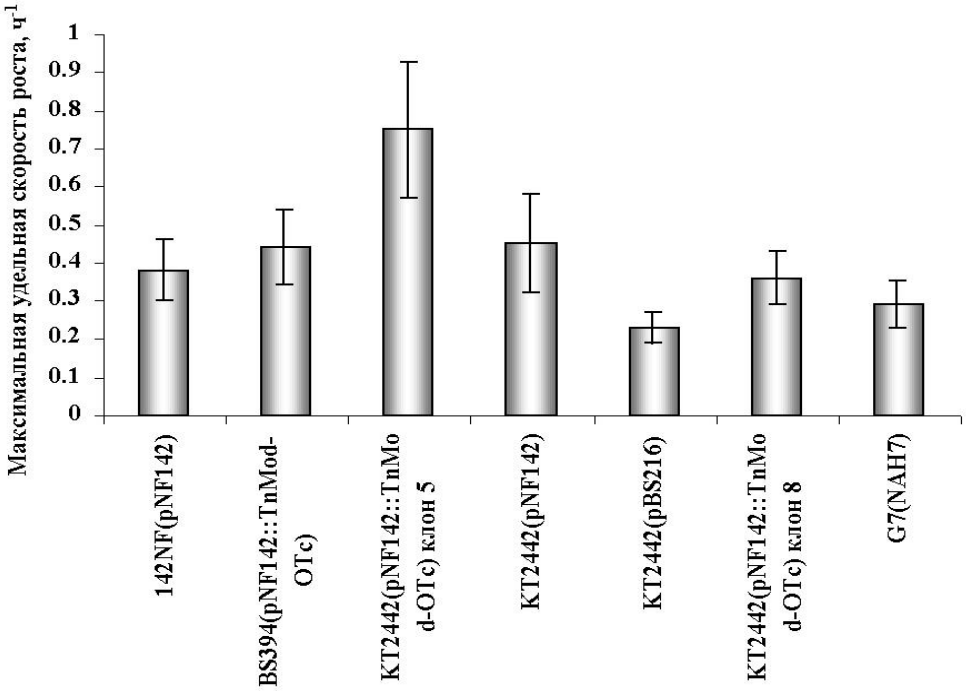


Рис. 37 Максимальные удельные скорости роста штаммов - деструкторов нафталина

3.3.3 Горизонтальный перенос плазмид биодеградации нафталина в лабораторных условиях

Изучение процесса горизонтального переноса катаболических плазмид, популяционной динамики штаммов-деструкторов и биодеградации нафталина в почве проводили в лабораторных микрокосмах по следующей схеме (Рис. 38). Для оценки абиотической убыли нафталина использовали микрокосм 1, содержащий стерильную почву. Вклад аборигенных микроорганизмов в деградацию оценивали по убыли нафталина в микрокосме 2, содержащем нестерильную почву. Исследования популяционной динамики микроорганизмов и горизонтального переноса катаболических плазмид проводили в микрокосмах 3-5. Численность интродуцированных и аборигенных бактерий-деструкторов нафталина в начале эксперимента составляла 2,0-4,0×104 и 1,3×104 КОЕ/г сухой почвы, соответственно (около 3,2-6,2% и 2,1% от общей численности почвенных микроорганизмов). Наличие

хромосомных репортерных генов gfp и резистентности к канамицину и рифампицину позволило проследить за судьбой интродуцированного в почву бесплазмидного штамма КТ2442, а ауксотрофность – за судьбой плазмидосодержащего штамма BS394(pNF142::TnMod-OTc). Гены биодеградации нафталина и резистентности к тетрациклину в составе меченой плазмиды позволили вести наблюдение ее переноса в модельной почве. 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 КТ2442.

Рис. 38 Схема лабораторного эксперимента (во всех вариантах в почву вносили нафталин из расчета 2 г/кг почвы). Серым цветом выделены нестерильные микрокосмы

3.3.3.1 Характеристика аборигенных деструкторов нафталина

Из нестерильной почвы, используемой в эксперименте, были выделены 5 штаммов аборигенных нафталиновых деструкторов, обозначенные как АР1-АР5. Данные штаммы отличались между собой морфологическими признаками (цвет, величина и форма колоний), антибиотикорезистентностью и спектром утилизируемых субстратов). Данные микроорганизмы были грамотрицательными, флуоресцировали на среде Кинга Б и росли на среде PIA (*Pseudomonas* Isolation Agar). По результатам рестрикционного анализа амплифицированной 16S рДНК с использованием эндонуклеаз *Msp*II и *Rsa*I штаммы АР1-АР3 были предварительно идентифицированы как *Pseudomonas fluorescens*, штаммы АР4, АР5 – как *Pseudomonas putida* путем сравнения рестрикционных профилей с ранее полученными профилями штаммов *P. putida* mt-2 и *P. fluorescens* 2-79.

Для доказательства плазмидной локализации генов биодеградации нафталина и конъюгативности несущих их плазмид были поставлены скрещивания, в которых в качестве доноров использовали аборигенных деструкторов нафталина АР1-АР5, а реципиентом был бесплазмидный штамм КТ2442. Селекцию вели по нафталину, контрселекция осуществлялась по рифампицину для штаммов – АР1-АР3 и по канамицину – для штаммов АР4, АР5. Трансконъюганты были получены только в скрещиваниях со штаммами АР4 и АР5. Частота переноса составила: для штамма АР4 – $5{,}0\times10^{-8}$, для штамма АР5 – $1{,}0\times10^{-7}$ на клетку донора.

Из почвенных деструкторов нафталина АР1-АР5 была выделена тотальная ДНК. С помощью ПЦР было показано наличие гена *nahAc* в данных штаммах (данные не приводятся). Обнаружено, что штаммы АР4 и АР5 содержат плазмиды размером около 90 т.п.н. Рестрикционные профили препаратов плазмидной ДНК (Рис. 39), выделенных из аборигенных штаммов АР4 и АР5 и гидролизованных эндонуклеазами рестрикции *Eco*RI и *Pst*I, были сходны между собой и профилем меченой плазмиды.

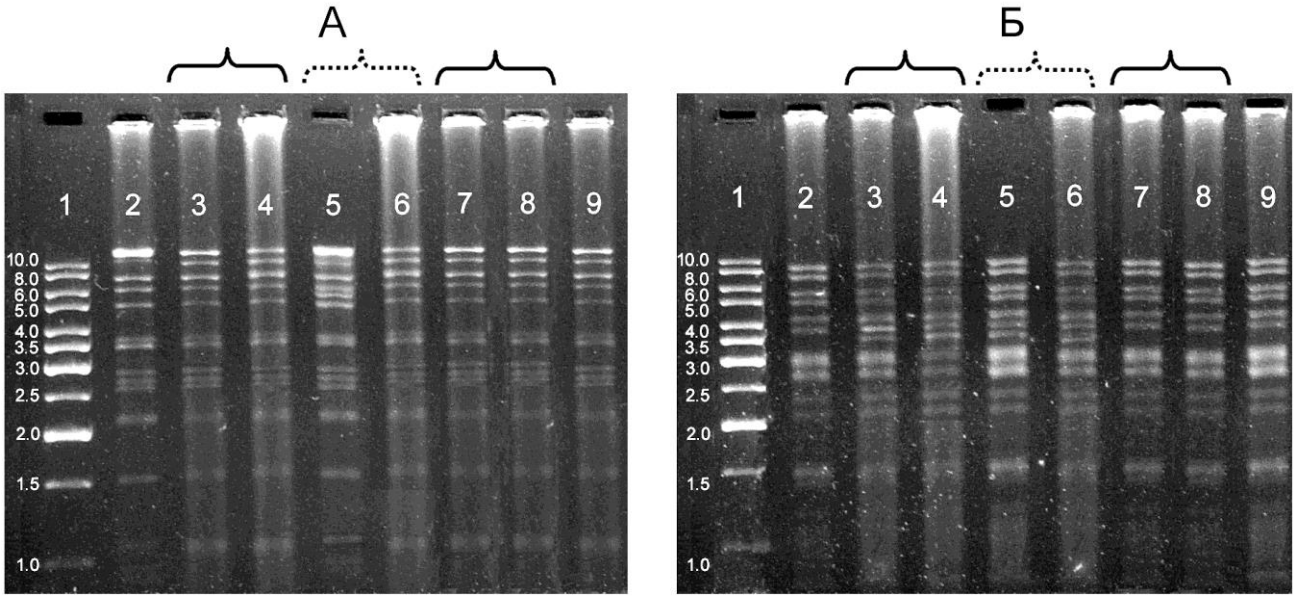


Рис. 39 Рестрикционные профили препаратов плазмидной ДНК, обработанных эндонуклеазами рестрикции EcoRI (А) и PstI (Б): 1 – 1 kb Ladder Gene Ruler («Fermentas», Литва), 2 – pNF142, 3 – pAP35, 4 – pAP36, 5 – pAP4, 6 – pAP5, 7 – pNF142::TnMod-OTc (KT2442 клон 1), 8 – pNF142::TnMod-OTc (KT2442 клон 21), 9 – исходная pNF142::TnMod-OTc.

3.3.3.2 Динамика общей численности микроорганизмов и бактерий-деструкторов нафталина в модельной почве

Сравнение динамики общей численности микроорганизмов и численности деструкторов нафталина в различных микрокосмах (Рис. 40) показало, что во всех вариантах наблюдалось снижение численности микроорганизмов в первые сутки, которое может быть обусловлено токсическим влиянием нафталина и адаптацией микроорганизмов к условиям микрокосмов.

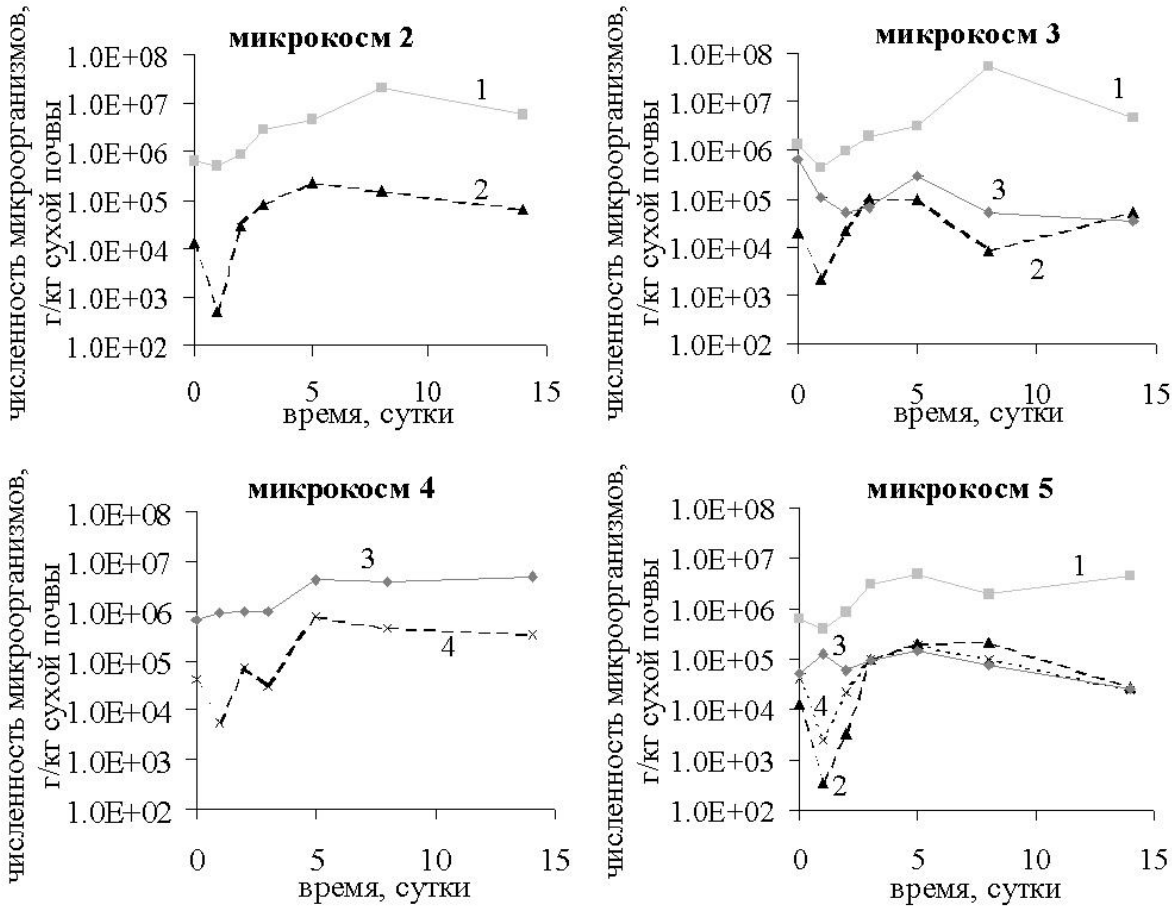


Рис. 40 Динамика численности микроорганизмов в почвенных микрокосмах: микрокосм 2 – контроль с нестерильной почвой, микрокосм 3 – нестерильная почва с бесплазмидным штаммом КТ2442; микрокосм 4 – стерильная почва со штаммами BS394(pNF142::TnMod-OTc) и КТ2442; микрокосм 5 – нестерильная почва со штаммами BS394(pNF142::TnMod-OTc) и КТ2442; 1 – общая численность почвенных микроорганизмов, 2 – численность аборигенных деструкторов нафталина, 3 – численность бесплазмидного штамма КТ2442, 4 – численность штамма BS394(pNF142::TnMod-OTc).

После периода адаптации со вторых суток наблюдался рост численности интродуцированного штамма-деструктора BS394(pNF142::Tn*Mod*-OTc), достигавшей значений $1{,}8\times10^5$ и $7{,}7\times10^5$ КОЕ/г сухой почвы в микрокосмах 4 и 5, соответственно. На пятые сутки в нестерильной почве доля инокулированного донора BS394(pNF142::Tn*Mod*-OTc) и реципиента КТ2442 (микрокосм 5) составила 3,9% и 3,2% от общей численности почвенных микроорганизмов, соответственно. Существенные отличия численности микроорганизмов наблюдались только в микрокосме 4, содержавшем стерильную почву, инокулированную донорным

штаммом BS394(pNF142::Tn*Mod*-OTc) и бесплазмидным реципиентным штаммом КТ2442. Так, максимальная численность донора в стерильной почве (микрокосм 4) на 5 день составила $7,7\times10^5$ КОЕ/г сухой почвы, превысив численность донора ($1,8\times10^5$ КОЕ/г сухой почвы) в нестерильной почве (микрокосм 5) более чем в 4 раза. Общая численность микроорганизмов и численность нафталиновых деструкторов в микрокосме 4 на порядок превышала таковые в микрокосме 5, содержащем нестерильную почву с тем же донором и реципиентом.

3.3.3.3 Динамика убыли нафталина в почве и горизонтальный перенос плазмид биодеградации в бактериальных популяциях

Как видно из рисунка 41А, в процессе абиотической деградации нафталина в микрокосме 1 концентрация данного соединения уменьшилась на 42±4% к 14 суткам эксперимента.

Убыль нафталина в микрокосме 2, содержащем аборигенные микроорганизмы-деструкторы нафталина, составила 57±3% на 14 сутки (Рис. 41Б). В микрокосме 3 с нестерильной почвой и бесплазмидным штаммом КТ2442 концентрация нафталина уменьшилась на 68±5% на 14 сутки эксперимента (Рис. 41В).

Сравнение потребления нафталина в микрокосмах 4 и 5 выявило достоверные отличия. Так, убыль нафталина на 14 сутки в микрокосме 5, содержащем нестерильную почву с инокулированными штаммами, составила 60±5%, а в микрокосме 4, содержащем стерильную почву с аналогичными микроорганизмами, – 87±3% (0,1 г/ кг почвы) (Рис. 11В).

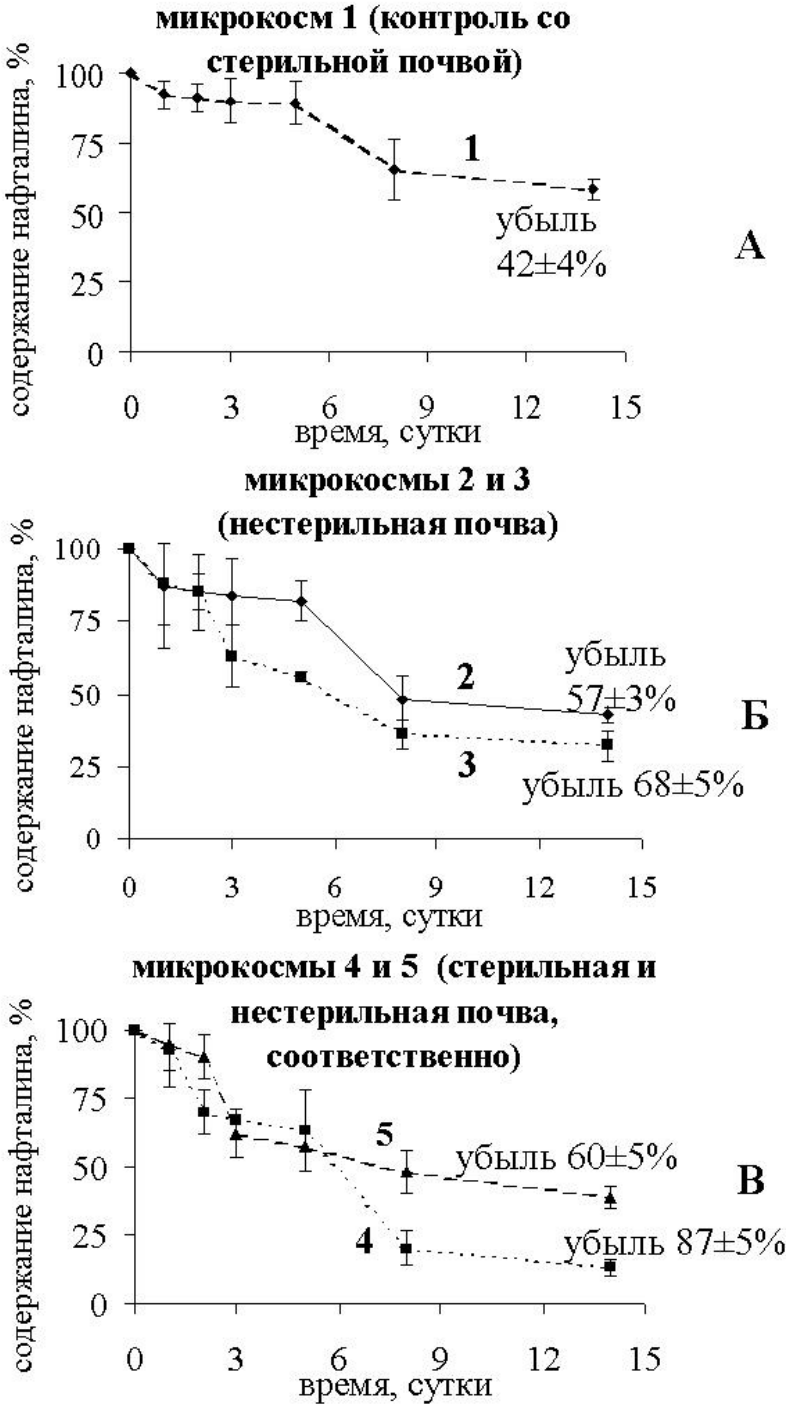


Рис. 41 Сравнительная динамика убыли нафталина в почве: нафталин вносили из расчета 2 г/кг сухой почвы, 1-5 - соответствующие микрокосмы (в микрокосм 3 внесен бесплазмидный штамм КТ2442, в микрокосмы 4-5 внесены BS394(pNF142::TnMod-OTc) и КТ2442.

В микрокосме 3 наблюдался перенос аборигенных плазмид биодеградации нафталина в интродуцированный реципиентный штамм КТ2442 (Рис. 42). На 14 сутки численность трансконъюгантов в почве достигла 10^3 КОЕ/г сухой почвы, что составило 1% от общей численности деструкторов нафталина.

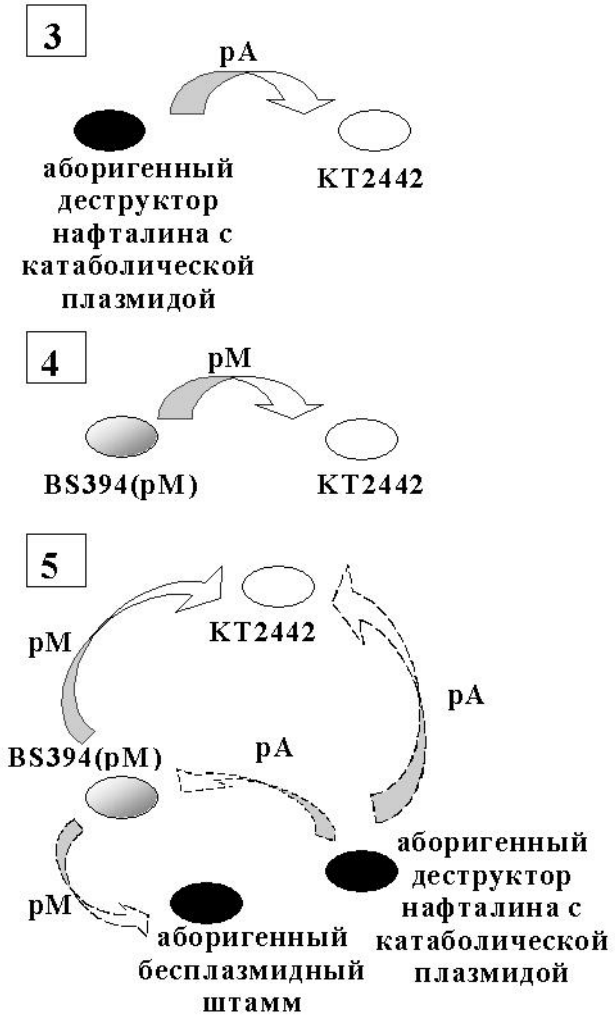


Рис. 42 Схема возможных направлений переноса плазмид биодеградации нафталина в почвенных микрокосмах (стрелки со сплошной границей – перенос в эксперименте показан; стрелки с прерывистой границей – переноса не зафиксировано), 3-5 – микрокосмы, pA – аборигенная плазмида биодеградации нафталина, pM – меченая плазмида pNF142::TnMod-OTc.

В микрокосмах 4, 5 также происходил горизонтальный перенос меченой катаболической плазмиды pNF142::Tn*Mod*-OTc из интродуцированного в почву донорного штамма BS394 в бесплазмидный штамм КТ2442 с частотой 10^{-5} /кл донора, который был зарегистрирован на 8 сутки в микрокосме 4 и на 2 сутки в микрокосме 5

(Рис. 42). С использованием ПЦР с праймерами Acl49f и Ac1014r (Ferrero et al., 2002) было показано наличие гена *nahAc* в трансконъюгантах КТ2442(pAP35) и КТ2442(pAP36), выделенных из почвы микрокосма 3 (клоны 35 и 36), и штамма КТ2442(pNF142::Tn*Mod*-OTc), выделенных из почвы микрокосмов 4 и 5 (клоны 1 и 21). Рестрикционный анализ препаратов аборигенных плазмид биодеградации нафталина, выделенных из трансконъюгантных штаммов КТ2442 клоны 35 и 36, выявил их сходство с аборигенными плазмидами, выделенными из природных штаммов АР4 и АР5 (Рис. 39), что подтверждает факт переноса аборигенных катаболических плазмид. Кроме того, показано, что рестрикционные профили меченой плазмиды pNF142::TnMod-OTc и аборигенных плазмид из штаммов АР4 и АР5 также подобны профилю ранее описанной плазмиды биодеградации нафталина pDTG1, выделенной из почвы вблизи Bangor, Wales, UK (Dennis, Zylstra, 2004).

3.3.3.4 Оценка активности ключевых ферментов катаболизма нафталина бактерий-деструкторов

Была проведена оценка активностей ключевых ферментов катаболизма нафталина у аборигенных микроорганизмов АР1-АР5 (табл. 22). В данных штаммах показана высокая активность фермента катехол-2,3-диоксигеназы (К23О) (524-951 нМ мин$^{-1}$ [мг белка]$^{-1}$) и сравнительно невысокая активность салицилатгидроксилазы (4-14 нМ мин$^{-1}$ [мг белка]$^{-1}$). Во всех штаммах активность фермента катехол-1,2-диоксигеназы (К12О) была на порядок ниже, чем активность К23О.

Также была исследована активность ключевых ферментов биодеградации нафталина в штаммах 142NF(pNF142), BS394(pNF142::Tn*Mod*-OTc), КТ2442(pNF142::Tn*Mod*-OTc) и трансконъюгантных штаммах КТ2442 с аборигенными и меченой плазмидами, полученными в результате горизонтального переноса в модельной почве (табл. 30). В исходном штамме 142NF(pNF142) активность К23О преобладает над активностью К12О, т.е. окисление катехола происходит преимущественно по мета-пути. Трансконъюганты штамма КТ2442 с аборигенными катаболическими плазмидами (клоны 35 и 36) проявляли различную активность ферментов окисления катехола. Величина активности К12О в клоне 36 была одной из самых высоких среди исследованных штаммов, активности же К23О не было отмечено. Следует заметить, что при переносе меченой плазмиды pNF142::Tn*Mod*-OTc из штамма BS394 в реципиент КТ2442 в почве возникали трансконъюгантные штаммы (клоны 1 и 21), в которых, как и в исходном штамме

КТ2442(pNF142::Tn*Mod*-OTc) (табл. 30), преобладает активность фермента *орто*-пути окисления катехола (К12О), т.е. плазмидный ген деградации катехола не экспрессируется. При обратном переносе плазмиды pNF142::Tn*Mod*-OTc в штамм BS394 активность фермента *мета*-пути окисления катехола (К23О) восстанавливалась.

Табл. 30. Активности ключевых ферментов биодеградации нафталина трансконъюгантных клонов штамма КТ2442, содержащих катаболические плазмиды, аборигенных почвенных деструкторов и исходных штаммов.

Штамм	Активность ферментов, нМ/мин (мг белка)			
	НО	СГ	К23О	К12О
Исходные штаммы				
КТ2442	н/о	н/о	0	73
142NF(pNF142)	39	49	285	92
394(pNF142::Tn*Mod*-OTc)	24	30	352	28
КТ2442(pNF142::Tn*Mod*-OTc)	32	80	6	185
Аборигенные деструкторы нафталина				
АР1	38	4	**730**	74
АР2	17	4	**374**	80
АР3	60	5	**951**	85
АР4(pAP_4)	16	5	**360**	68
АР5(pAP_5)	21	14	**524**	136
Трансконъюганты				
КТ2442(pAP35) клон 35	23	**107**	17	9
КТ2442(pAP36) клон 36	13	**48**	1	248
КТ2442(pNF142::Tn*Mod*-OTc) клон 1	38	62	3	202
КТ2442(pNF142::Tn*Mod*-OTc) клон 21	30	93	5	170

НО – нафталиндиоксигеназа, СГ – салицилатгидроксилаза, К23О – катехол-2,3-диоксигеназа, К12О – катехол-1,2-диоксигеназа. Серым цветом выделены высокие активности ферментов

Значительных различий в активностях нафталиндиоксигеназы не наблюдалось. Следует отметить, что в трансконъюгантах штамма КТ2442 (клоны 35 и 36) отмечена высокая активность фермента салицилатгидроксилазы (48 и 107 нМ/мин [мг белка]),

почти на порядок превышавшая таковую у четырех аборигенных штаммов – деструкторов нафталина (табл. 30).

Поскольку убыль нафталина в микрокосме 3 шла быстрее, чем в микрокосме 2 (рис. 41В), было сделано предположение о возможной кооперации аборигенных деструкторов нафталина и трансконъюгантов, образующихся в процессе биодеградации. Для подтверждения данного предположения был проведен опыт в условиях периодического культивирования с аборигенным штаммом-деструктором нафталина АР1, который обладал низкой СГ активностью и высокой К23О активностью, и трансконъюгантным штаммом КТ2442(pAP35) клон 35, содержащим аборигенную плазмиду, в жидкой минеральной среде, содержащей нафталин. В процессе эксперимента оценивали численность микроорганизмов и накопление промежуточного продукта деградации нафталина - салицилата.

Как видно из рисунка 43, как в случае со штаммом АР1, так и в варианте со смешанной культурой данных штаммов, динамика численности бактерий была сопоставимой. Следует отметить, что в смеси штаммов численность КТ2442(pAP35) клон 35 в первые 20 часов была на порядок ниже численности штамма АР1 (около 10% от численности АР1).

Накопление салициловой кислоты наблюдалось в обоих случаях, причем в варианте со смешанной культурой штаммов концентрация салицилата увеличивалась в два раза быстрее. Максимальное накопление салициловой кислоты было отмечено через 12 часов культивирования, причем при культивировании штамма АР1 на нафталине ее концентрация составила 88,64 мг/мл, а в смеси микроорганизмов – 168,33 мг/мл. После 12 часов в обоих случаях наблюдалось потребление салицилата; во втором варианте потребление, как и накопление до этого, происходило быстрее. Динамика концентрации салицилата, таким образом, косвенно свидетельствует о более активном метаболизме смешанной культуры штаммов, поскольку в ней накопление и потребление салицилата, а, следовательно, и нафталина, было более активным.

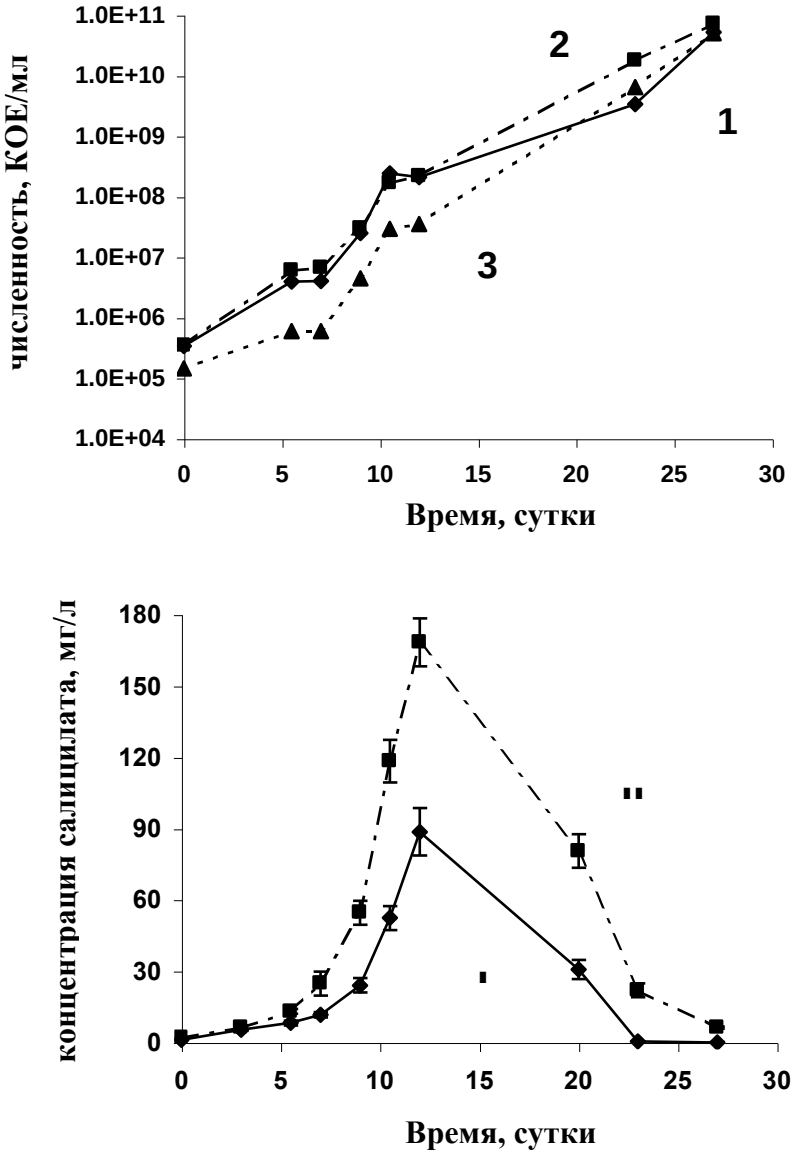


Рис. 43 Динамика численности бактерий и накопления салициловой кислоты в условиях периодического культивирования в жидкой минеральной среде с нафталином аборигенного штамма-деструктора АР1 и трансконъюгантного штамма КТ2442(рАР35) клон 35: 1 – численность аборигенного штамма АР1 в чистой культуре, 2 – численность аборигенного штамма АР1 в смешанной культуре, 3 – численность штамма КТ2442(рАР35) в смешанной культуре, I – динамика концентрации салицилата в чистой культуре, II – динамика концентрации салицилата в смешанной культуре.

3.3.4 Горизонтальный перенос плазмид биодеградации нафталина в почве в открытой окружающей среде

3.3.4.1. Мониторинг интродуцированных маркированных бесплазмидных и плазмидосодержащих штаммов, их выживаемости и конкурентоспособности в открытой окружающей среде

Маркированные штаммы-деструкторы нафталина рода *Pseudomonas* KT2442(pNF142::Tn*Mod*-OTc), BS394(pNF142::TnMod-OTc), также как и бесплазмидный KT2442 были внесены в почву опытного участка, находившегося рядом с очистными сооружениями г.Пущино (Рис. 44). Мониторинг интродуцированных штаммов проводили по хромосомным маркерам Gfp, Km^r, Rif^r, Cys^-, а меченых плазмид – по маркерам Nah^+ и Tc^r.

Участок 1 **Контроль**	**Участок 2** **Контроль** **с нафталином**
Участок 3 **KT2442(pNF142::Tn*Mod*-OTc)**	**Участок 4** **KT2442(pNF142::Tn*Mod*-OTc)** **нафталин**
Участок 5 **KT2442 и** **BS394(pNF142::Tn*Mod*-OTc)**	**Участок 6** **KT2442 и** **BS394(pNF142::Tn*Mod*-OTc)** **нафталин**

Рис. 44 Схема полевого эксперимента по изучению горизонтального переноса катаболических плазмид (сентябрь-ноябрь 2002 г., г.Пущино).

На участке 1 без нафталина в первые 12 сут произошло увеличение численности аборигенных штаммов-деструкторов нафталина с $2{,}0\times10^2$ до $5{,}0\times10^4$ КОЕ $г^{-1}$ сухой почвы (Рис. 45), что, по всей видимости, связано с увеличением влажности почвы вследствие интенсивных осенних дождей и кратковременного повышения температуры среды (Рис. 46). Наложившееся селективное давление нафталина на участке 2 дополнительно стимулировало рост аборигенных деструкторов нафталина. Их численность выросла в первые 12 сут на 3,5 порядка (с $6{,}0\times10^2$ до $3{,}2\times10^6$ КОЕ $г^{-1}$ сухой почвы), а после 30 сут стала убывать (Рис. 45).

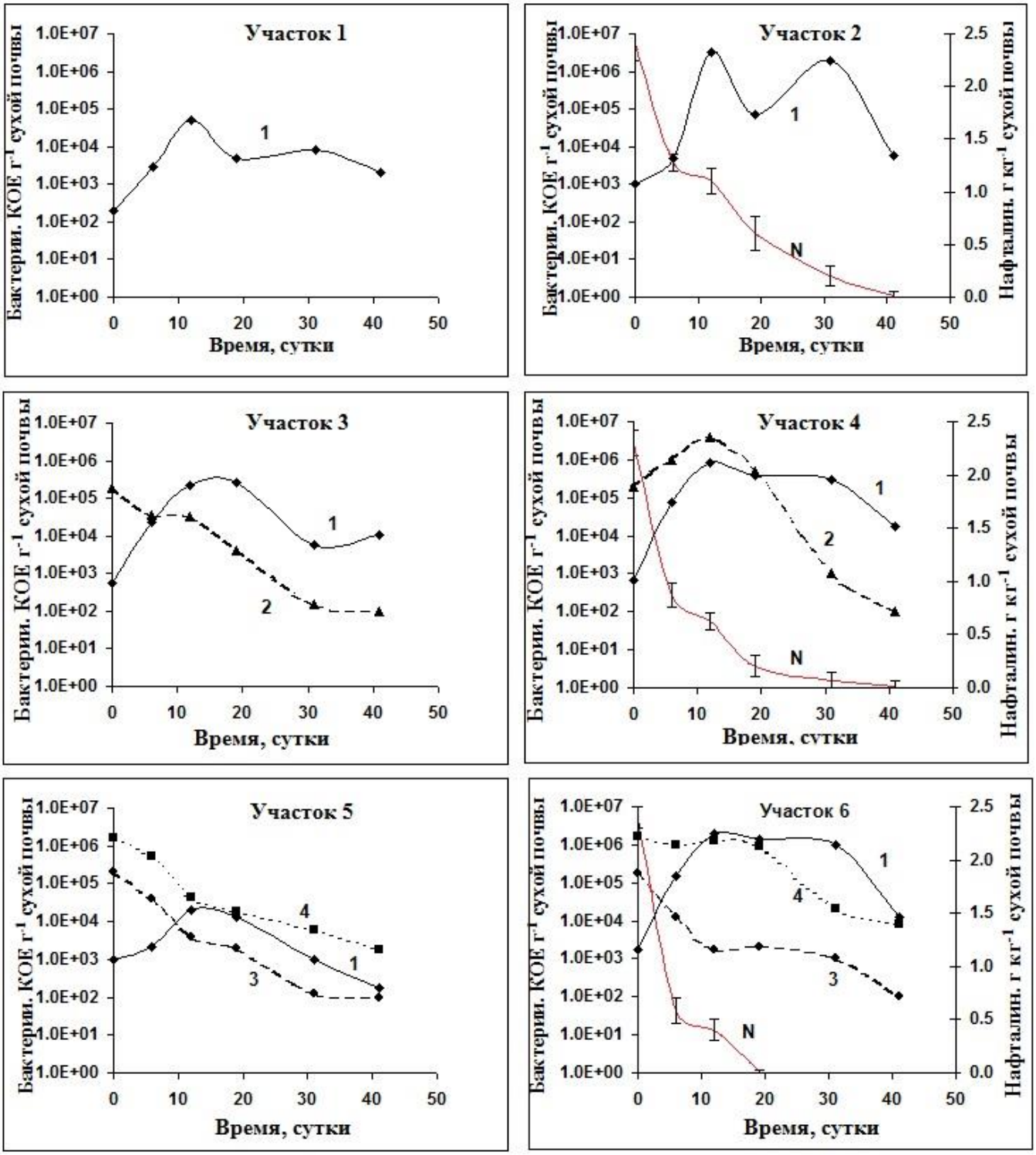


Рис. 45 Динамика численности микроорганизмов и содержания нафталина в почве

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

В почву участков 3 и 4 был интродуцирован штамм KT2442(pNF142::Tn*Mod*-OTc). В условиях без селективного давления (участок 3) данный штамм по численности уступал аборигенным деструкторам нафталина и постепенно погибал (Рис. 45). В присутствии нафталина (участок 4, Рис. 45) данный штамм доминировал над численностью аборигенных деструкторов, причем в первые 12 сут его численность увеличилась более чем на 1 порядок (с $2{,}0\times10^5$ до $4{,}0\times10^6$ КОЕ/г$^{-1}$ сухой почвы). Однако, после 20 сут произошло резкое падение численности штамма, вероятно, вызванное резким похолоданием (Рис. 46).

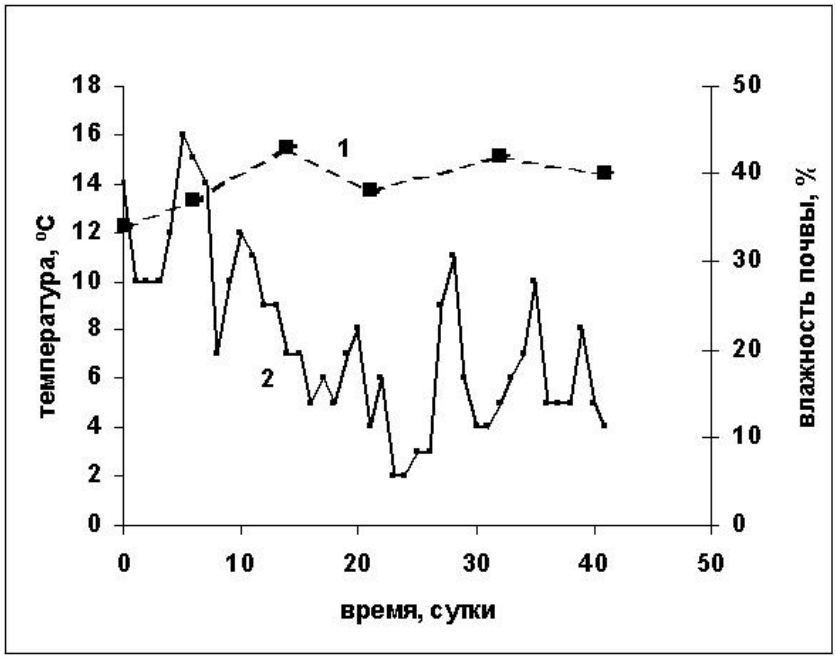


Рис. 46 Динамика влажности почвы (1) и температуры воздуха (2) в ходе эксперимента.

На участках 5 и 6 (Рис. 45) интродуцированный плазмидосодержащий штамм BS394 вел себя так же, как и плазмидосодержащий KT2442 на участках 3 и 4, соответственно. В условиях селективного давления (участок 6) его численность оставалась на исходном уровне, снизившись после 20 сут лишь с наступлением заморозков; без нафталина (5 участок) штамм BS394 элиминировался из почвы.

Следует отметить, что на всех трех участках (2, 4, 6) убыль нафталина происходила с разной скоростью (Рис. 45). Так, медленнее всего концентрация нафталина снижалась на контрольном участке (0,2 г/кг сухой почвы на 30 сутки),

быстрее – на четвертом (0,06 г/кг сухой почвы), и максимально быстро – на шестом (уже на 20 сутки нафталина практически не было [0,01 г/кг сухой почвы]).

3.3.4.2 Горизонтальный перенос плазмид биодеградации в почвенных микробных популяциях

Показано, что в почве с нафталином и без него (участки 4-6), плазмида pNF142::Tn*Mod*-OTc (Рис. 47) переносилась в аборигенные почвенные бактерии (главным образом, флюоресцирующие *Pseudomonas*, так же как в бесплазмидный штамм KT2442 с частотой 2×10^{-7} - 4×10^{-6}).

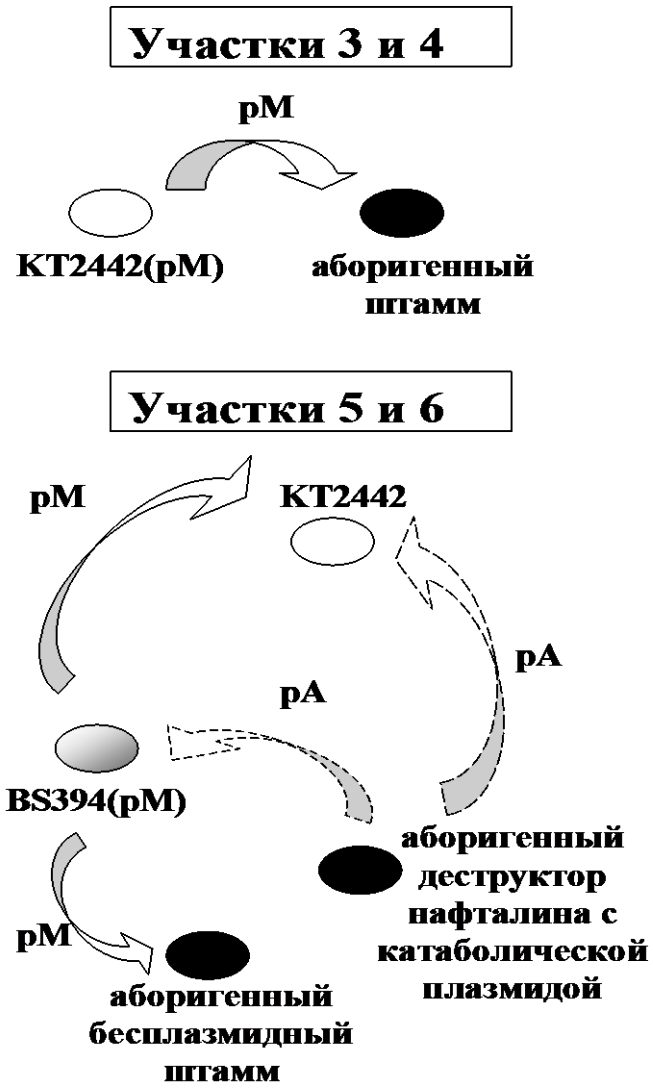


Рис. 47 Схема возможных направлений переноса плазмид биодеградации нафталина в почве в открытой окружающей среде (стрелки со сплошной границей – перенос в эксперименте показан; стрелки с прерывистой границей – переноса не зафиксировано): pM – плазмида pNF142::TnMod-OTc, pA – аборигенная плазмида биодеградации нафталина.

На участке 4 было выделено 4 трансконъюганта, на участке 5 – 9. Наибольшее количество трансконъюгантов (21) было получено на участке 6, причем в последнем случае 20 из них было представлено аборигенными бактериями, получившими меченую плазмиду. Аборигенные бактерии, содержащие плазмиду pNF142::Tn*Mod*-ОТс, были определены путем частичного секвенирования 16S рДНК как таксономически близкие с *P. lini, P. frederiksbergensis, P. jesseni, P. graminis, P. putida* и *P. alcaligenes*. Рестрикционные профили плазмидной ДНК, выделенной из трансконъюгантов и гидролизованной эндонуклеазой *Eco*RI, были сходными с профилем плазмиды pNF142::Tn*Mod*-ОТс (Рис. 48). Из картин рестрикции препаратов плазмидной ДНК, выделенной из штаммов *P. frederiksbergensis* OSP3 и *Pseudomonas* sp. OSP10 видно появление дополнительных фрагментов, обусловленное, по всей видимости, внутриплазмидными перестройками.

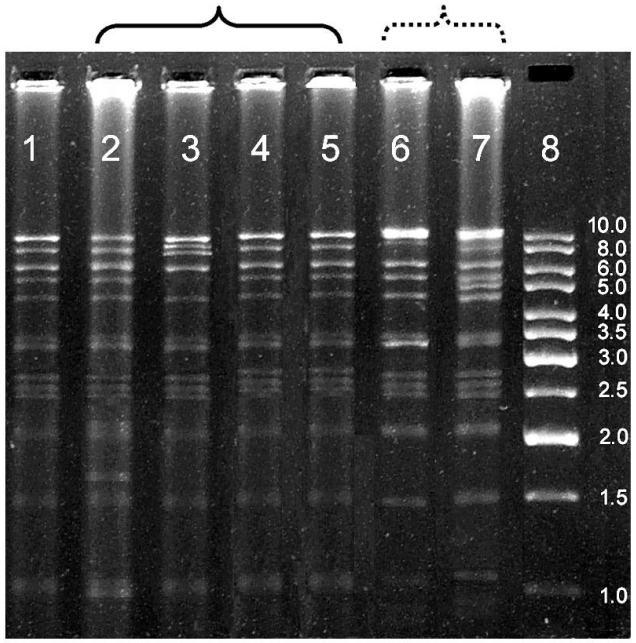


Рис. 48 Рестрикционные профили препаратов плазмиды pNF142::TnMod-OTc, выделенных из различных штаммов и обработанных эндонуклеазой рестрикции EcoRI: 1 – исходный штамм KT2442, 2-5 – аборигенные трансконъюганты (2 – P. frederiksbergensis OSP3, 3 – Pseudomonas sp. OSP10, 4 – P. putida OSP16, 5 – P. putida OSP19), 6-7 – трансконъюганты штамма KT2442 (6 – клон 25, 7 – клон 22), 8 – 1 kb Ladder Gene Ruler™ (“Fermentas”).

3.4 Образование биологических ПАВ бактериями – эффективными нефтедеструкторами

3.4.1 Характеристика способности микроорганизмов-нефтедеструкторов к продуцированию биоПАВ

Пять микроорганизмов – эффективных нефтедеструкторов были изучены на способность к образованию биоПАВ при росте на различных субстратах. При проведении скрининга оценивали следующие параметры: содержание биосурфактантов, поверхностное натяжение, индекс эмульгирования и эмульгирующую активность.

Содержание гликолипидных биосурфактантов определяли в бесклеточном супернатанте по содержанию углевода методом фотоколориметрии. Пересчёт содержания углевода на содержание биосурфактанта осуществляли в соответствии с табл. 8. Для сравнения образования биоПАВ выращивание микроорганизмов осуществляли на среде Эванса с различными источниками углерода и энергии.

Анализ полученных результатов (табл. 31) позволяет заключить, что наилучшим субстратом является гексадекан: использование этого вещества как ростового субстрата во всех вариантах способствовало образованию наибольшего количества гликолипидов для каждого штамма. Как видно из представленных данных (табл. 31), при использовании этого субстрата микроорганизмы штамма *P. putida* BS3701 продуцируют на 25% больше гликолипидов, чем *P. fluorescens* 142NF. При росте на глюкозе и нафталине псевдомонады выделяли примерно в 10-20 раз меньше биоПАВ, чем на гексадекане. При выращивании микроорганизмов штамма *Rhodococcus* sp. S26 на гексадекане было достигнуто максимальное среди всех остальных вариантов содержание биоПАВ: 780 мг/л. При культивировании этого штамма на остальных изученных субстратах достигнутые значения содержания гликолипидов ниже на порядок. Содержание гликолипидов в культуральной среде штамма *Rhodococcus* sp. X5 при росте на нефти было выше, чем на гексадекане, но незначительно: 440±30 мг/л и 400±30 мг/л, соответственно, а использование ДТ как ростового субстрата для образования биосурфактантов оказалось значительно менее эффективным (70 мг/л). Для микроорганизмов штамма *Rhodococcus* sp. S67 достаточно высокое содержание гликолипидов получено при росте на гексадекане (табл. 31). Использование глюкозы как ростового субстрата для родококков оказалось менее эффективным: содержание гликолипидов не превышала 50 мг/л для всех трёх изученных штаммов, что, однако, выше, чем у псевдомонад.

Для дальнейшей характеристики поверхностно-активных свойств образуемых микроорганизмами биоПАВ измеряли поверхностное натяжение культуральной жидкости, индекс эмульгирования культуральной жидкости и бесклеточного супернатанта, эмульгирующую активность бесклеточного супернатанта. Для сравнения этих характеристик изучаемые микроорганизмы выращивали на гексадекане и на глюкозе.

Табл. 31. Содержание гликолипидов в бесклеточном супернатанте исследуемых микроорганизмов при росте на различных субстратах.

Штамм	Ростовой субстрат	Содержание гликолипидов, мг/л
P. fluorescens 142NF	глюкоза	10±2
	гексадекан	190±10
	нафталин	11±2
P. putida BS3701	глюкоза	19±3
	гексадекан	250±20
	нафталин	12±2
Rhodococcus sp. S67	ДТ	100±8
	гексадекан	310±20
	нефть	180±10
	глюкоза	49±3
Rhodococcus sp. X5	ДТ	70±8
	гексадекан	400±30
	нефть	440±30
	глюкоза	42±3
Rhodococcus sp. S26	ДТ	61±5
	гексадекан	780±80
	нефть	50±4
	глюкоза	19±3

Эмульгирующая активность, измеренная по методике визуального определения, была наибольшей у штаммов *Rhodococcus* sp. S67 и *Rhodococcus* sp. X5 (по 4 балла). У трёх остальных микроорганизмов ниже, но достаточно высока: 2-3 балла (табл. 32).

Минимальные значения поверхностного натяжения для всех пяти микроорганизмов были получены при росте на гексадекане и оказались практически одинаковы: 31-33 мН/м, что говорит о высокой эффективности продуцируемых биоПАВ (табл. 32). При использовании глюкозы, достигнутые значения поверхностного натяжения оказались выше: 49-61 мН/м. Это согласуется с измеренными значениям содержания гликолипидов.

Индексы эмульгирования культуральной жидкости при росте бактерий на гексадекане также были выше, чем при использовании глюкозы. Наибольшие значение этой характеристики отмечены для двух штаммов родококков, выращенных на гексадекане: 78% для S67 и 75% для X5. Для трех других микроорганизмов на том же субстрате значение этой величины оказалось несколько ниже: 47-53%. Индексы эмульгирования, полученные при росте бактерий на глюкозе, не превышали 33%. После удаления клеток центрифугированием бесклеточные супернатанты всех бактерий, выращенных на гексадекане, полностью сохраняли способность к эмульгированию. При использовании глюкозы только для представителей рода *Pseudomonas* отмечено образование эмульсий. Индексы эмульгирования бесклеточных супернатантов родококков, полученных с этим субстратом, составили 0% (табл. 32).

Значения эмульгирующей активности, измеренной фотоколориметрическим методом, у родококков, выращенных на гексадекане, составили 0,7-1,5 ед. опт. плотн. (табл. 32). Максимальная эмульгирующая активность отмечена у микроорганизмов штамма *Rhodococcus* sp. S26, как и максимальное содержание гликолипидов. Бесклеточный супернатант родококков, полученный при росте на глюкозе, демонстрировал низкую активность (0,2-0,3) и, что говорит об образовании клеточносвязанных биоПАВ. Эмульгирующая активность для псевдомонад, оказалась близка для обоих субстратов.

Для проверки способности микроорганизмов синтезировать биоПАВ эндо-типа был определён индекс эмульгирования клеточных суспензий микроорганизмов, полученных на твёрдых агаризованных средах, которые содержали водорастворимые субстраты: глюкозу (среда Э) или бакто-триптон (среда ЛБ). Установлено, что клеточные суспензии всех изученных штаммов рода *Rhodococcus* способны стабилизировать эмульсии (табл. 33). Значения индексов эмульгирования для этих микроорганизмов составили 35-48%. Для клеток псевдомонад, выращенных на гидрофильных субстратах показано отсутствие эмульгирования гексадекана.

Табл. 32. Поверхностно-активные свойства микроорганизмов при росте на различных субстратах.

Штамм	Ростовой субстрат	Поверхностное натяжение, мН/см	E_{24}, %		Эмульгирующая активность	
			К.ж.[1)]	Б.с.[2)]	визуально	опт. плотн. [3)]
P. fluorescens 142NF	гексадекан	34±1	50±6	50±5	2	0,9±0,1
	глюкоза	54±1	33±2	33±2	–	1,1±0,2
P. putida BS3701	гексадекан	34±1	53±4	53±5	2	0,6±0,1
	глюкоза	61±1	33±2	33±2	–	0,5±0,1
Rhodococcus sp. S67	гексадекан	33±1	78±4	78±7	4	0,7±0,1
	глюкоза	53±1	7±2	0	–	0,3±0,1
Rhodococcus sp. X5	гексадекан	31±1	75±9	75±4	4	1,0±0,2
	глюкоза	56±1	29±4	0	–	0,2±0,1
Rhodococcus sp. S26	гексадекан	32±1	47±9	47±8	3	1,5±0,3
	глюкоза	49±1	29±3	0	–	0,2±0,1

[1)] – индекс эмульгирования измерен для культуральной жидкости
[2)] – индекс эмульгирования измерен для бесклеточного супернатанта
[3)] – оптическая плотность эмульсии (λ=540 нм)

Таким образом, все исследованные микроорганизмы-нефтедеструкторы, входящие в состав биопрепаратов для очистки территорий от нефтезагрязнений, способны образовывать гликолипиды. Максимальная эффективность продуцирования биоПАВ наблюдается при росте на гексадекане для всех штаммов. При этом представители рода *Rhodococcus* на всех субстратах образуют значительно больше экзо-биосурактантов, чем *Pseudomonas*. Рост родококков на гидрофильных субстратах сопровождается образованием связанных с клеткой биоПАВ.

Табл. 33. Эмульгирующие свойства суспензий клеток, выращенных на агаризованных средах.

Штамм	Питательная среда	E_{24}, %
P. fluorescens 142NF	среда Е+глюкоза	0
	среда ЛБ	0
P. putida BS3701	среда Е+глюкоза	0
	среда ЛБ	0
Rhodococcus sp. S67	среда Е+глюкоза	35±4
	среда ЛБ	40±5
Rhodococcus sp. X5	среда Е+глюкоза	38±4
	среда ЛБ	46±5
Rhodococcus sp. S26	среда Е+глюкоза	46±6
	среда ЛБ	48±6

3.4.2 Выделение биоПАВ, продуцируемых микроорганизмами-нефтедеструкторами

Для выделения биоПАВ микроорганизмы рода *Pseudomonas* выращивали на глюкозе, *Rhodococcus* – на гексадекане. Культуральную жидкость освобождали от клеток центрифугированием. Супернатант подкисляли до pH 2,0 и проводили экстракцию биосурфактанта смесью хлороформ:метанол. Растворитель удаляли на роторном испарителе. Полученный осадок жёлтого цвета использовали в дальнейшем исследовании.

Для идентификации биоПАВ с помощью ТСХ использовались алюминиевые пластинки с нанесенным на них сорбентом – силикагелем, относящимся к полярным неорганическим сорбентам.

Для элюирования компонентов при проведении анализа гликолипидных биоПАВ методом ТСХ используют различные системы. Было проведено сравнение систем, состоящих из следующих компонентов (по объему):

1) хлороформ:метанол:вода (65:25:4);

2) хлороформ:метанол:вода:уксусная кислота (65:15:2:2);

3) хлороформ:метанол:вода (65:15:2);

4) хлороформ:метанол:вода (60:30:1).

Наиболее четкое разделение компонентов исследуемых гликолипидов в экстракте *Rhodococcus* sp. X5 было достигнуто при использовании системы хлороформ:метанол:вода (65:15:2) (рис. 49), следовательно, данная система обладает максимально подходящим соотношением полярностей для разделения биосурфактантов. Для разделения и идентификации гликолипидов в пробах родококков в дальнейшей работе использовали её. При проведении ТСХ экстрактов псевдомонад при использовании всех элюентов наблюдалось единственное пятно, для дальнейшей работы использовали систему хлороформ:метанол:вода (65:25:4).

При проявлении хроматограмм с помощью реагента α-нафтол с серной кислотой, во всех пяти исследованных экстрактах появлялись окрашенные сине-фиолетовым цветом пятна, свидетельствующие о наличии углевода в молекуле соединении. Проявление хроматограмм с нингидрином не выявило фиолетово-розовых пятен.

Очистку биоПАВ проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле. Для очистки трегалолипидов, продуцируемых родокками, элюирование проводили хлороформом для удаления гексадекана. Для выявления лучшего элюента, позволяющего провести дальнейшую очистку наиболее эффективно, проводили сравнение трёх систем, различных по соотношению компонентов хлороформ:метанол (по объёму): 10:3; 10:2 и 10:1. Как было установлено, при использовании элюента с соотношением 10:3 (рис. 50а) трегалолипиды родококков элюируются вместе с примесью жёлтого пигмента, так что разделить эти компоненты не удается. На рис. 50б видно, что при использовании соотношения 10:2 основные сигналы гликолипидов находятся во второй фракции и пигмент, элюируемый раньше, уже не мешает. Дальнейшее снижение доли метанола не приводит к улучшению разделения компонентов (рис. 50в). Таким образом, использование элюента хлороформ:метанол (10:2) обеспечивает наилучшее качество элюирования для образцов трегалолипидов, продуцируемых родококками.

При очистке рамнолипидов псевдомонад с использованием любого из элюента 10:3; 10:2 или 10:1 пигмент эффективно удалялся, но время элюирования рамнолипидов оказалось слишком большим. Для ускорения процесса использовали элюент хлороформ:метанол (1:1).

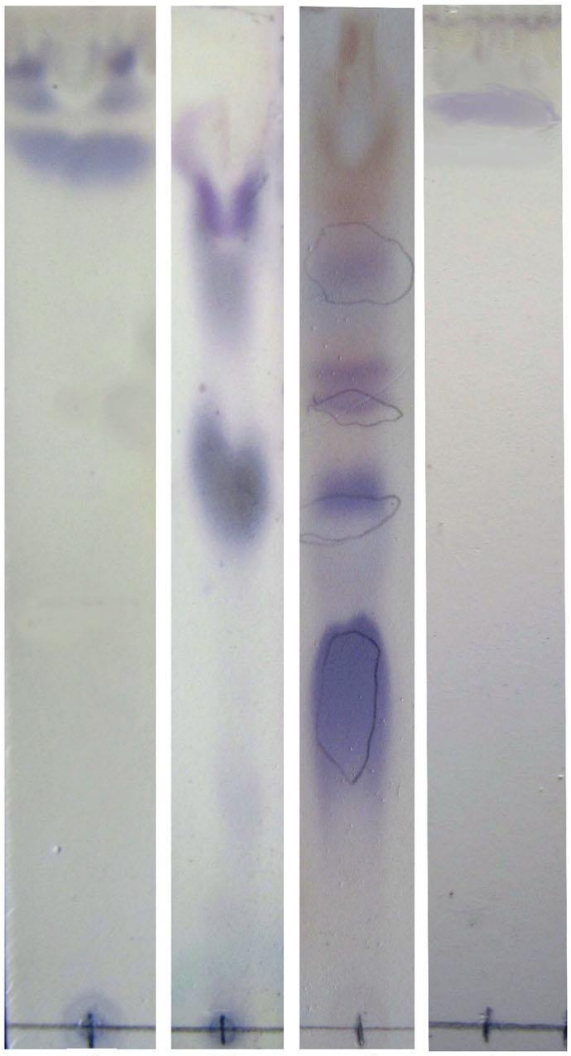


Рис. 49 Хроматограммы неочищенного экстракта (штамм Rhodococcus sp. X5) при использовании различных систем элюирования: а) хлороформ:метанол:вода (65:25:4); б) хлороформ:метанол:вода:уксусная кислота (65:15:2:2); в) хлороформ:метанол:вода (65:15:2); г) хлороформ:метанол:вода (60:30:1).

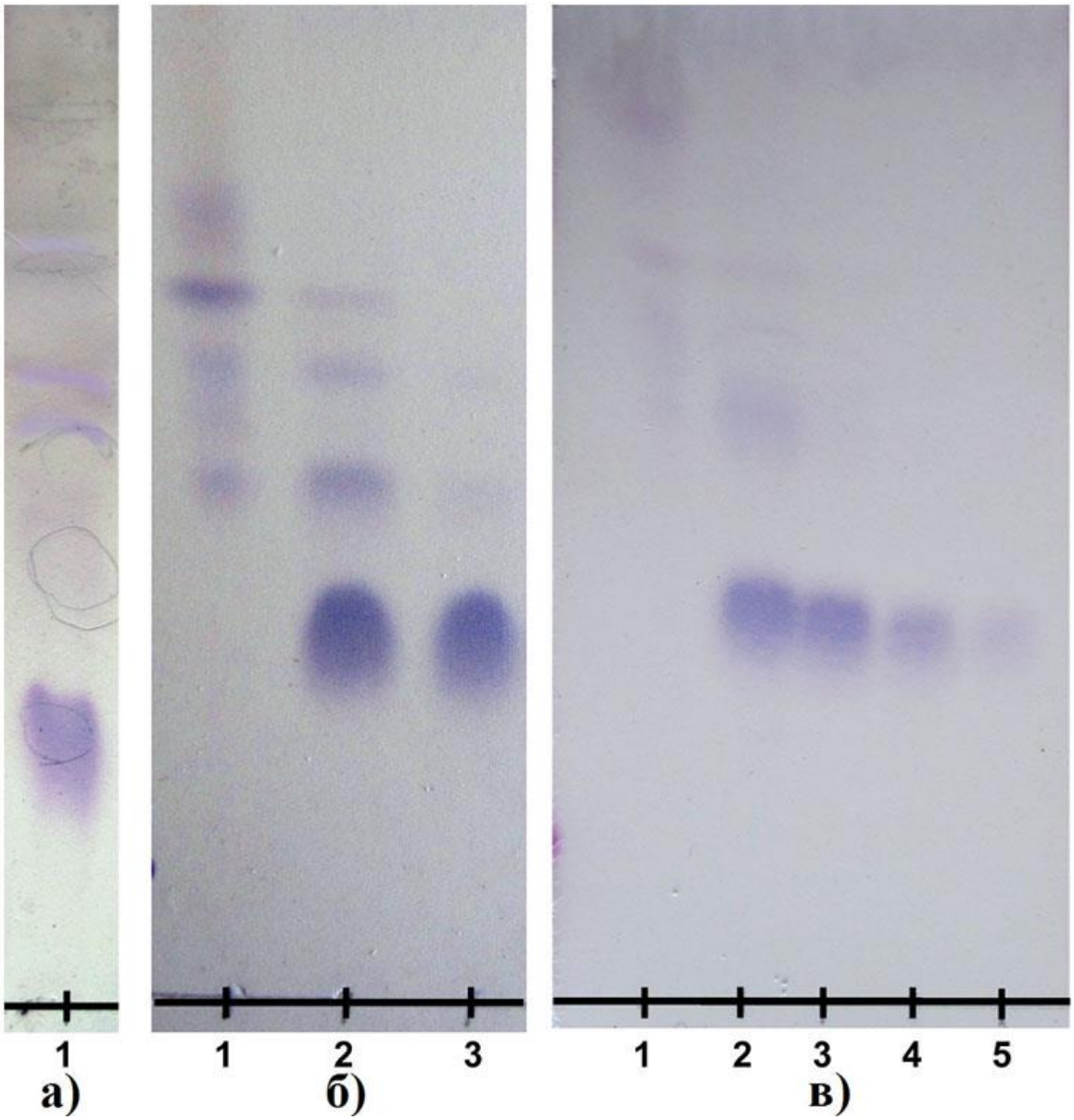


Рис. 50 Хроматограммы очищенных фракций после разделения биоПАВ, продуцируемых микроорганизмами штамма Rhodococcus sp. X5, с использованием элюентов различного состава (по объёму): а) хлороформ:метанол 10:3; б) хлороформ:метанол 10:2; в) хлороформ:метанол 10:1.
Цифрами отмечены фракции согласно порядку их выхода из колонки.

В результате проведённого подбора условий очистки биоПАВ было получено пять очищенных образцов биоПАВ, по одному для каждого из изученных микроорганизмов. Анализ методом ТСХ очищенных биосурфактантов обоих псевдомонад: *P. fluorescens* 142NF и *P. putida* BS3701, показал наличие единственного, но сильно размытого пятна, обнаруживаемого по фиолетовой окраске

при проявлении с α-нафтолом (рис. 51). Его величина удерживания составила R_f 0,35. Результаты ТСХ анализа трёх образцов родококков так же оказались сходными между собой. На хроматограммах можно выделить одно интенсивно окрашенное и размытое пятно с R_f 0,32, и несколько менее интенсивных с R_f 0,46; 0,51; 0,57 и 0,63. Отличие в образцах биоПАВ родококков заключается только в том, что на хроматограмме биоПАВ штамма *Rhodococcus* sp. S67 отсутствует пятно с R_f 0,51.

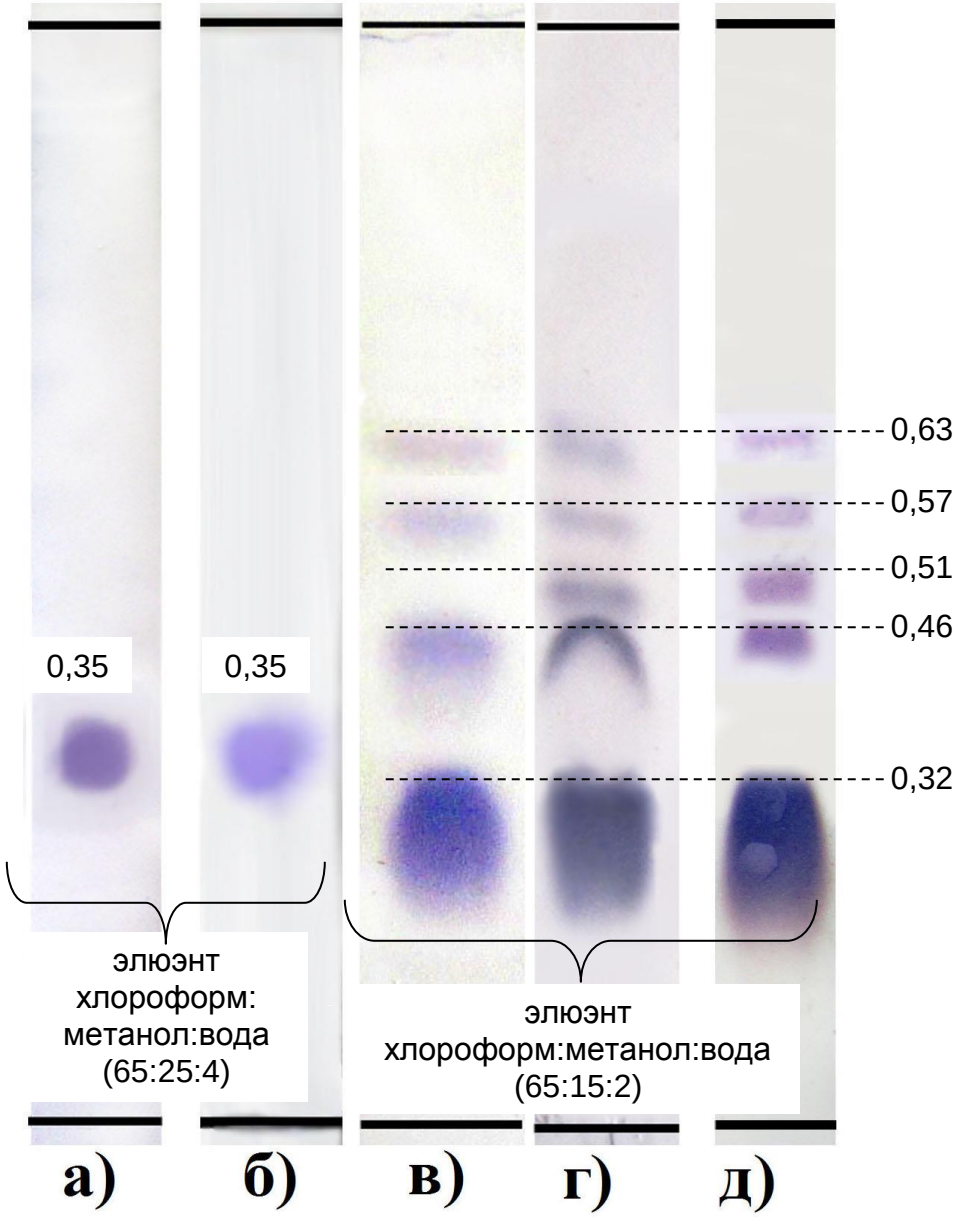


Рис. 51 Хроматограммы очищенных образцов биоПАВ, синтезируемых микроорганизмами: а) – P. fluorescens 142NF; б) – P. putida BS370; в) – Rhodococcus sp. S67; г) – Rhodococcus sp. X5; д) - Rhodococcus sp. S26. Числами указаны значения R_f.

Для сравнения свойств исходного экстракта и очищенных колоночной хроматографией образцов биосурфактантов, построили изотермы поверхностного натяжения соответствующих образцов биоПАВ, продуцируемых микроорганизмами штамма *Rhodococcus* sp. X5. На представленном рисунке видно, что они совпадают, что говорит о высоком содержании биоПАВ в неочищенном экстракте (рис. 52). Фотоколориметрический фенол-сернокислый анализ (п. 2.7) растворов, приготовленных по навескам, показал близкие значение оптической плотности (табл. 34).

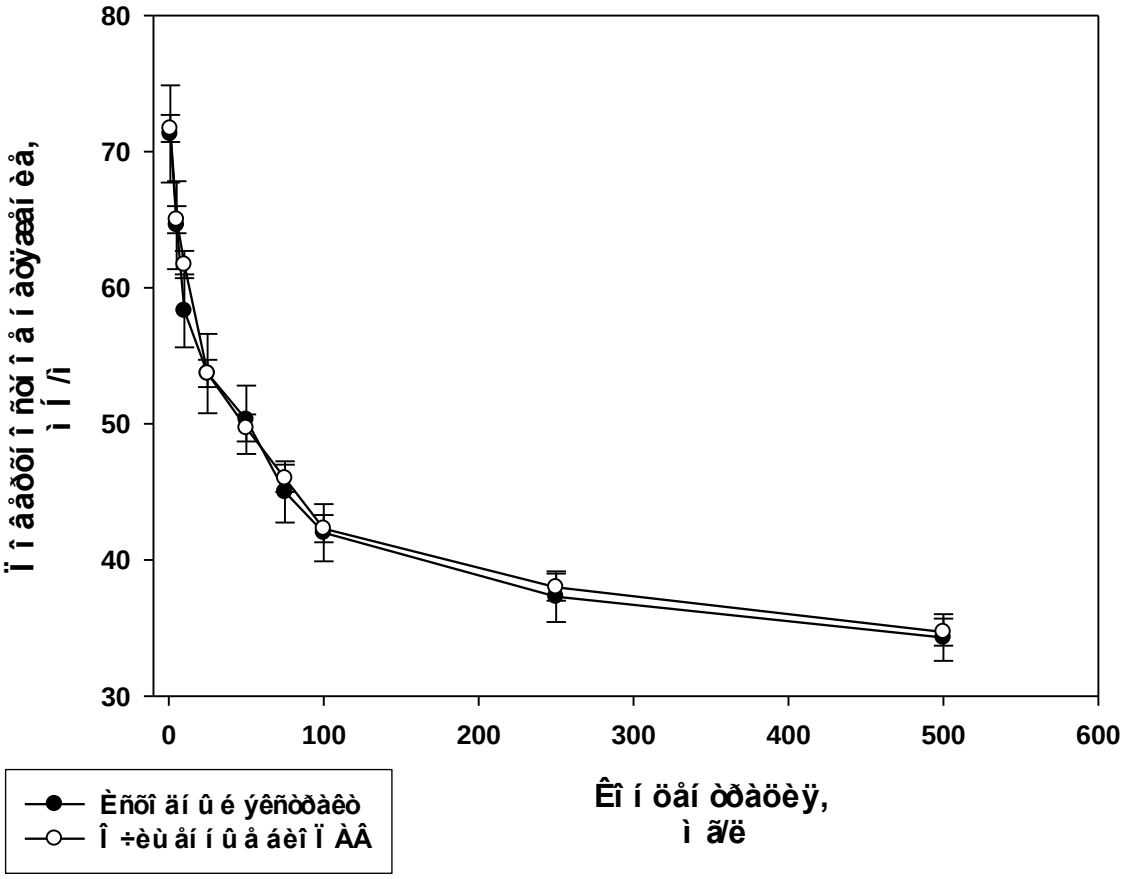


Рис. 52 Изотермы поверхностного натяжения растворов биоПАВ, продуцируемых микроорганизмами штамма Rhodococcus sp. X5.

Табл. 34. Оптическая плотность калибровочных растворов биоПАВ, продуцируемых микроорганизмами штамма Rhodococcus sp. X5.

Содержание, г/л	Образец	
	Исходный экстракт	Очищенные биоПАВ
0,05	0,11±0,03	0,11±0,05
0,1	0,28±0,05	0,31±0,08

3.4.3 Особенности структуры биоПАВ

Определение особенностей структуры очищенных колоночной хроматографией гликолипидных биоПАВ проводили методом масс-спектрометрии электронного спрея в режиме положительной ионизации и методом ИК-спектроскопии (метод МНВПО).

В образце биоПАВ, продуцируемых *P. fluorescens* 142NF, наблюдался ряд пиков в диапазоне 700-900: 705,5; 719,4; 733,4; 747,4; 761,4; 775,4; 789,4; 803,4; 817,4; 831,4; 845,4; 859,4; 873,4 и 887,5 Да (рис. 53). Относительная интенсивность сигналов равномерно возрастала до максимума, которому соответствовал молекулярный ион массой 803,4 Да, а затем снижалась. Разница между всеми соседними пиками составляла 14 Да. Аналогичные результаты получены и для биоПАВ, образуемых *P. putida* BS3701, за исключением незначительной разницы в интенсивности пиков: максимальная относительная интенсивность наблюдалась для молекулярного иона 789,4 Да, а сигнал 803,4 Да был вторым по интенсивности (рис. 54).

В масс-спектре образцов биоПАВ, синтезируемых микроорганизмами штаммов *Rhodococcus* sp. X5 и *Rhodococcus* sp. S26, также наблюдались сигналы, соответствующие одинаковым молекулярным ионам: 866,4; 871,5; 877,2; 894,4 и 899,6 Да (рис. 55-56), однако, значительно различающиеся по соотношению интенсивностей. В спектре биосурфактантов *Rhodococcus* sp. X5 наиболее интенсивный пик 899,6 Да; на 25% слабее пик 894,4 Да; интенсивности трех остальных лежат в пределах 25-30%. В образце биоПАВ штамма *Rhodococcus* sp. S26 максимальный по интенсивности пик 894,4 Да, чуть слабее 899,6 Да, сигналы 866,4 Да; 871,5 Да; 877,2 Да имели относительную интенсивность 49%, 44% и 75%, соответственно. Следует отметить, что разница масс между парами сигналов 899,9–871,5 и 894,4–866,4 составляет 28 Да.

В ИК-спектрах, полученных для образцов гликолипидов микроорганизмов *P. putida* BS3701 и *Rhodococcus* sp. X5 (рис. 57-58), наблюдаются широкая полоса

поглощения гидроксильной группы при 3450 $см^{-1}$ и интенсивные полосы при 2924 и 2852 $см^{-1}$, соответствующие валентным колебаниям алифатических связей С–Н. В области 1380 $см^{-1}$ можно выделить полосу поглощения деформационных колебаний связей С–Н. Поглощение валентных колебаний карбонильных групп сложных эфиров и карбоновых кислот наблюдается в областях 1745 $см^{-1}$ и 1630 $см^{-1}$, соответственно. Колебаниям связей С–О–С соответствует поглощение при 1047 $см^{-1}$.

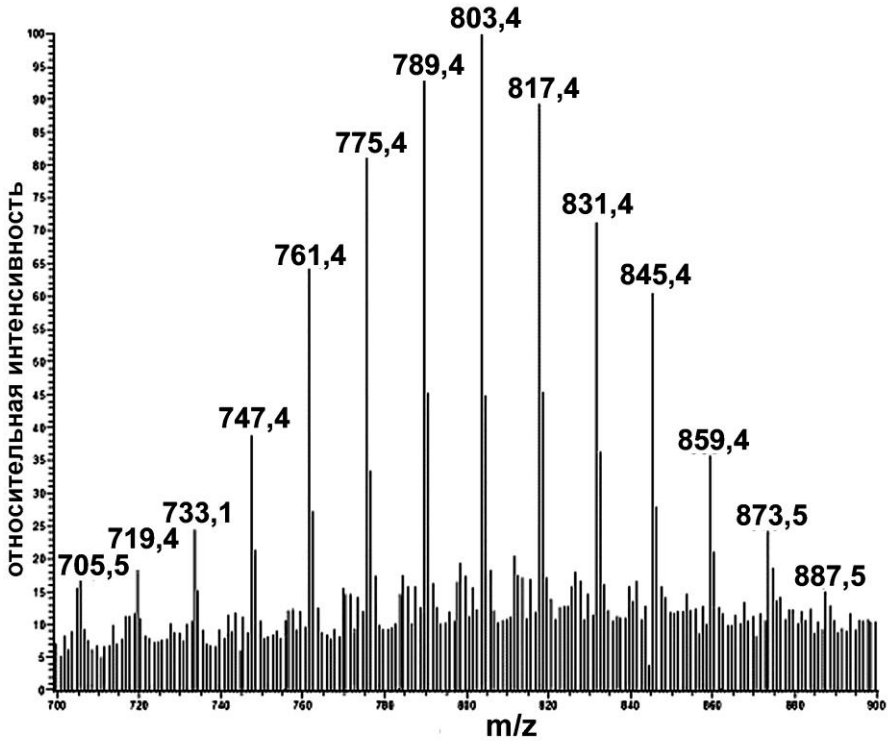


Рис. 53 Масс-спектр гликолипидных биоПАВ, продуцируемых микроорганизмами штамма P. fluorescens 142NF.

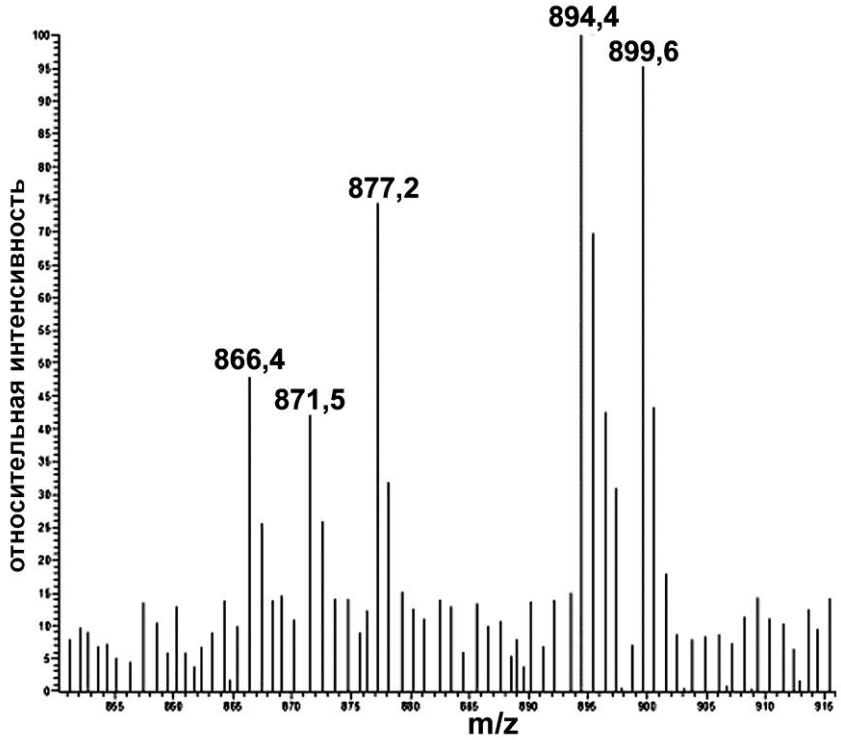


Рис. 54 Масс-спектр гликолипидных биоПАВ, продуцируемых микроорганизмами штамма P. putida BS3701.

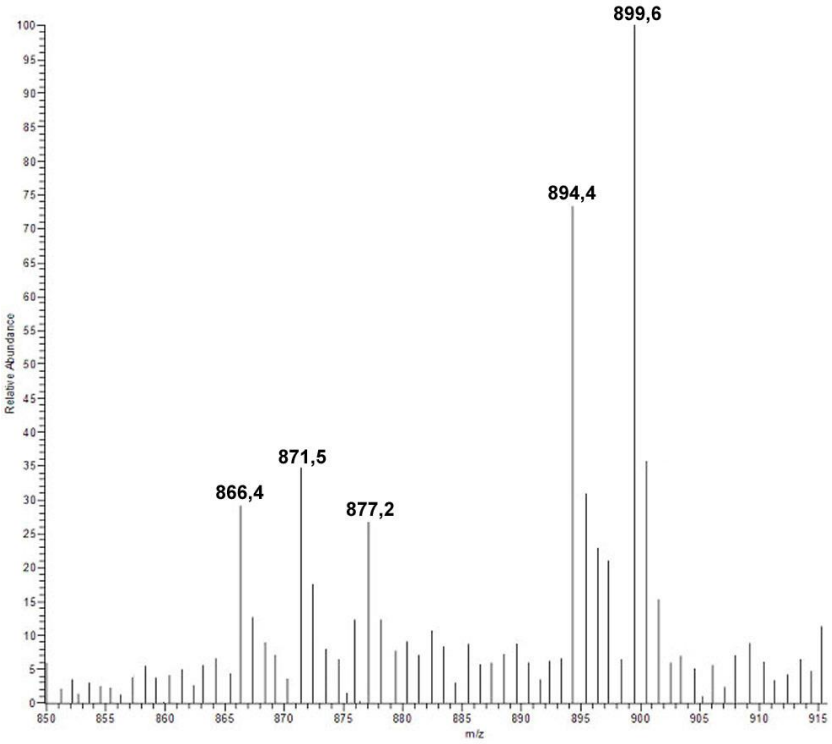


Рис. 55 Масс-спектр гликолипидных биоПАВ, продуцируемых микроорганизмами штамма Rhodococcus sp. X5.

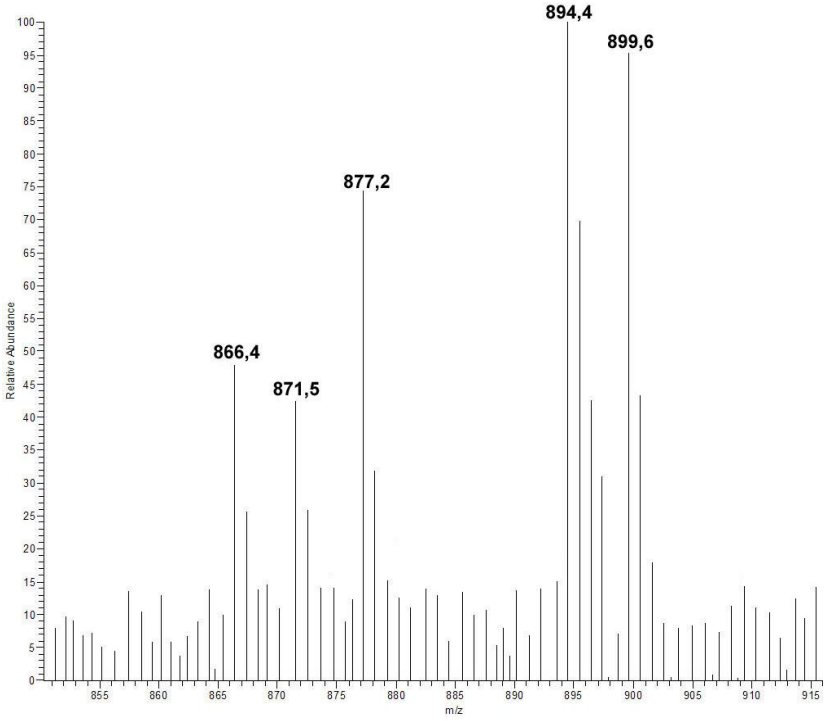


Рис. 56 Масс-спектр гликолипидных биоПАВ, продуцируемых микроорганизмами штамма Rhodococcus sp. S26.

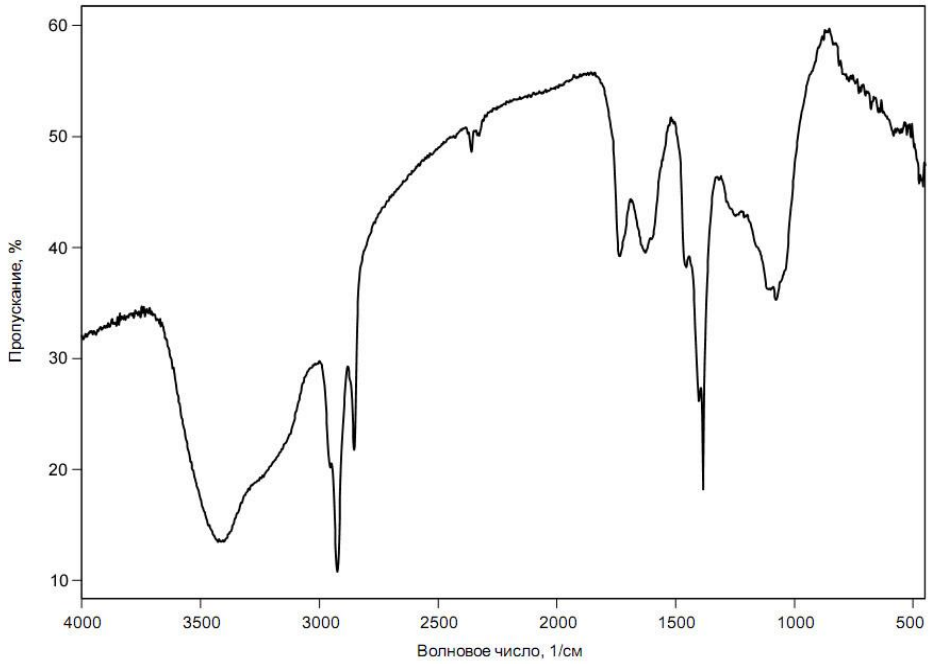


Рис. 57 ИК-спектр гликолипидных биоПАВ, продуцируемых микроорганизмами штамма P. putida BS3701

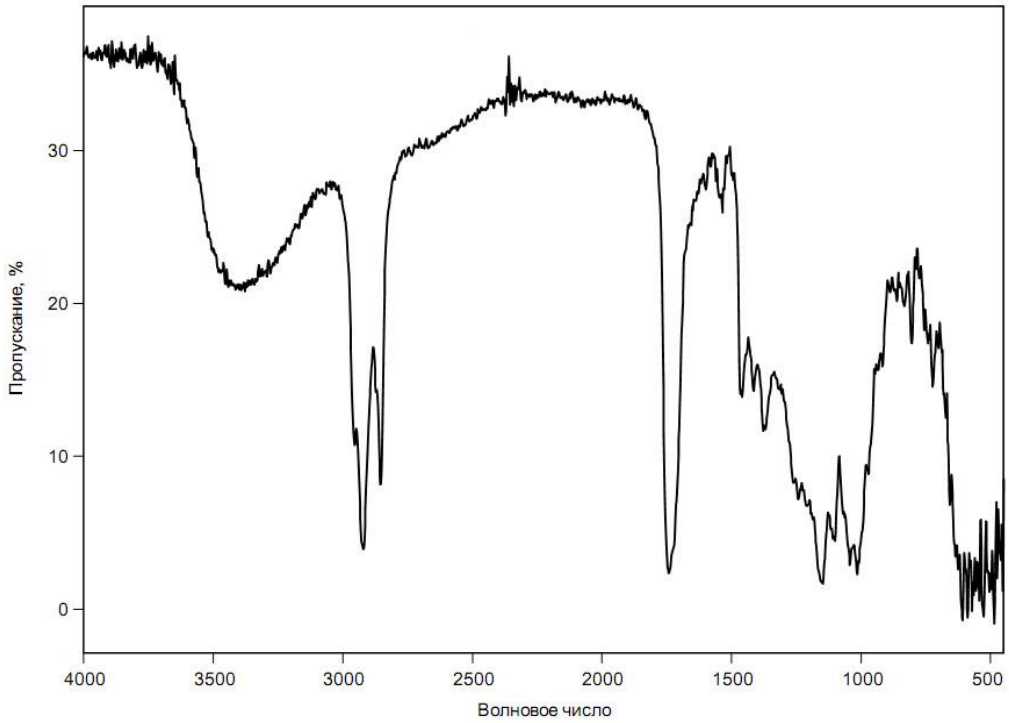


Рис. 58 ИК-спектр гликолипидных биоПАВ, продуцируемых микроорганизмами штамма Rhodococcus sp. X5.

3.5 Составление ассоциаций микроорганизмов, перспективных для использования в составе биопрепаратов

3.5.1 Составление и отбор ассоциаций микроорганизмов, способных к деградации углеводородов нефти при пониженной температуре

Для выбора ассоциации штаммов-деструкторов углеводородов нефти были использованы два различных подхода: составление ассоциации штаммов-деструкторов на основании анализа их физиологических, метаболических и деструктивных свойств, а также селекция при периодическом культивировании смешанной ассоциации микроорганизмов в жидкой минеральной среде с нефтью в качестве единственного источника углерода и энергии.

3.5.1.1 Подбор ассоциации штаммов-деструкторов на основании анализа их физиологических, метаболических и деструктивных свойств

Для составления ассоциации штаммов-деструкторов были проанализированы физиологические и метаболические характеристики исследованных микроорганизмов (Табл. 1, 2, 3, 4, 5, 6 и рис.15). На основании этого анализа был предложен следующий вариант ассоциации, состоящей из четырёх штаммов: *Rhodococcus* sp. S25, *Rhodococcus* sp. X5, *Rhodococcus* sp. S67 и *Pseudomonas* sp. 142NF(pNF142). Все эти микроорганизмы эффективно утилизируют различные фракции нефти при пониженной температуре. Кроме того, штамм *Rhodococcus* sp. S25 – обладал высоким значением оптической плотности культуральной жидкости после центрифугирования, следовательно выделял значительное количество биоПАВ в культуральную жидкость. Штамм *Rhodococcus* sp. X5 – способен к деградации дизельного топлива в присутствии 5-7% NaCl. Штамм *Rhodococcus* sp. S67 – имел наибольшее значение индекса эмульгирования, наиболее интенсивно снижал поверхностное натяжение и демонстрировал наибольшую степень деградации нефти при 4ºС. Штамм *Pseudomonas* sp. 142NF(pNF142) – проявлял галотолерантные свойства даже при пониженной температуре.

3.5.1.2.Селекция ассоциации штаммов-деструкторов при периодическом культивировании в жидкой минеральной среде с нефтью в качестве единственного источника углерода и энергии

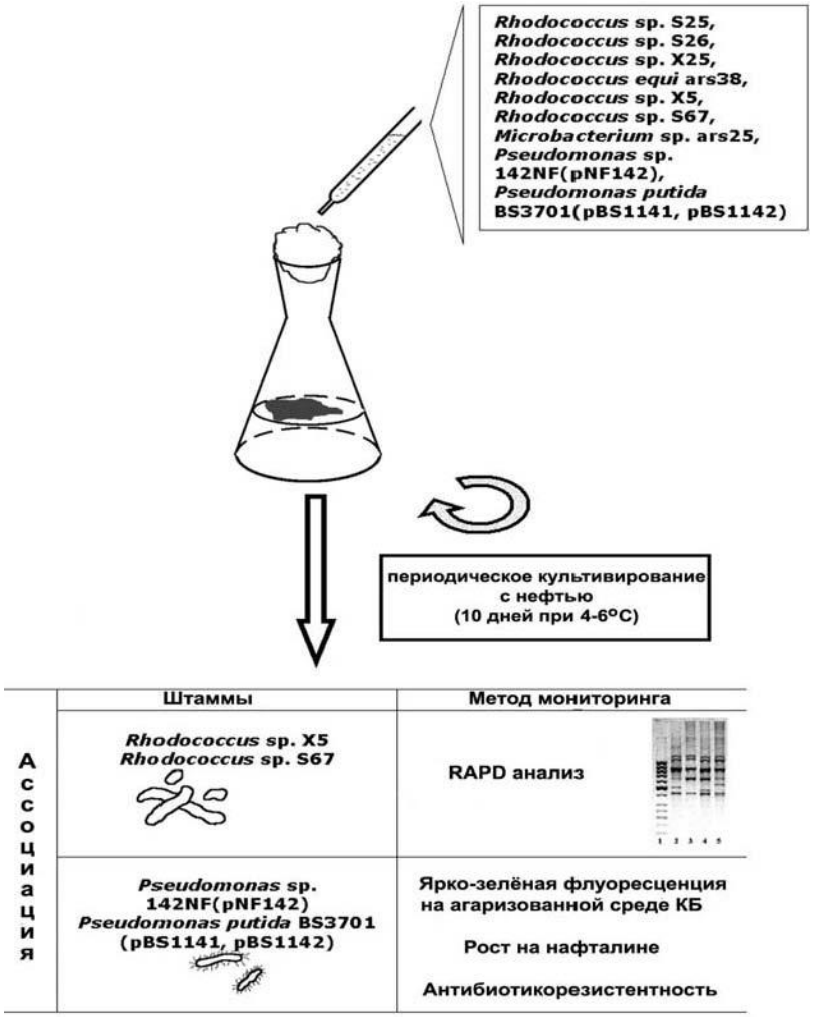


Рис. 59 Схема составления микробной ассоциации

Для селекции микроорганизмов использовали 9 наиболее активных психротрофных микроорганизмов-нефтедеструкторов, а именно: *Rhodococcus* sp. X25, *Rhodococcus* sp. X5, *Rhodococcus* sp. S25, *Rhodococcus* sp. S26, *Rhodococcus* sp. S67, *Pseudomonas fluorescens* 142NF(pNF142), *Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142), *Microbacterium* sp. Ars25 и *Rhodococcus equi* Ars38 (Рис. 59), которые в равных по численности соотношениях (1×10^6) были внесены в качестве инокулята в жидкую минеральную среду Эванса с 2 % нефти в качестве единственного источника углерода и энергии. Культивирование проводили в периодических условиях при

температуре 4°С и 24°С в течение 10 суток.

В результате была отселектирована ассоциация микроорганизмов, состоящая из *Rhodococcus* sp. X5, *Rhodococcus* sp. S67, *Pseudomonas fluorescens* 142NF(pNF142), *Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142). После 10 суток культивирования при 24°С 57% от общей популяции микроорганизмов составляли псевдомонады *Pseudomonas fluorescens* 142NF(pNF142), *Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142), а при 4°С — эти два штамма составляли 90% от общей популяции. При 24°С 80% общей популяции родококков было представлено штаммами *Rhodococcus* sp. S67 и *Rhodococcus* sp.X5, а при 4°С эти же два штамма составляли 70% общей популяции родококков.

Таким образом, с помощью двух различных подходов составлены микробные ассоциации (Табл. 35), состоящие каждая из четырёх штаммов-деструкторов. Причём три из четырёх микроорганизмов, входящих в состав каждой из ассоциации, являются одинаковыми.

Табл. 35. Микробные ассоциации, составлены с использованием двух различных подходов.

Ассоциация на основании анализа физиологических, метаболических и деструктивных свойств микроорганизмов	**Отселектированная ассоциация**
Rhodococcus sp. X5 *Rhodococcus* sp. S67 *Pseudomonas* sp. 142NF(pNF142) ***Rhodococcus* sp. S25**	*Rhodococcus* sp. X5 *Rhodococcus* sp. S67 *Pseudomonas* sp. 142NF(pNF142) ***Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142)**

Для выбора из этих двух ассоциаций более эффективной, было проведено сравнение степени деструкции нефти. Показано, что ассоциация, отобранная в процессе селекции микроорганизмов, более эффективно утилизирует углеводороды нефти: 11,4% против 7,8% за 10 суток при температуре 4°С. 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 в температурном диапазоне (от 4 до 32°С), что позволяет использовать их при биоремедиации нефтезагрязнённых территорий в различных регионах России; во-

вторых, деградация нефти и нефтепродуктов в присутствии 3–5% NaCl; в-третьих, при культивировании в минеральных средах с использованием в качестве источника углерода и энергии нефтепродуктов микроорганизмы синтезируют биоэмульгаторы и обладают высокой эмульгирующей активностью; в-четвёртых, бактерии рода *Pseudomonas* несут в своём составе конъюгативные плазмиды биодеградации ПАУ, наличие таких плазмид, способствует увеличению деградативного потенциала за счет распространения катаболических генов среди аборигенных микроорганизмов.

Следует отметить, что микробная ассоциация «МикроБак» активно деградирует углеводороды нефти при пониженной температуре (4°С), однако, она недостаточно эффективна при высоких концентрациях (более 15%) нефти и при содержании более 5% соли в среде, её диапазон pH 5 – 7.

3.5.2 Составление ассоциации штаммов, способных к деградации высоких концентраций нефти в широком температурном и pH диапазонах

7 эффективных штаммов микроорганизмов, способных к росту в широком диапазоне температур, отобранных на первом этапе работы (раздел 3.1.1), и 10 бактерий из коллекции коммерческой компании ЗАО «Биоойл» (Табл. 15) были исследованы на способность к деградации высоких концентраций нефти (до 40%), повышенной солености (до 10%) и в широком диапазоне pH. Характеристика этих 19 микроорганизмов подробно приведена в разделе 3.1.2.

Для составления ассоциации штаммов-деструкторов углеводородов нефти были последовательно использованы два подхода: 1) на основании анализа и последующего комбинирования физиологических, метаболических и деструктивных свойств микроорганизмов, а также наличия плазмид в штаммах бактерий; 2) селекция при периодическом культивировании смешанной ассоциации отобранных микроорганизмов в жидкой минеральной среде с нефтью в качестве единственного источника углерода и энергии.

Ассоциация для очистки почвы от нефти и нефтепродуктов была составлена на основе следующих критериев: способность к росту в жидкой минеральной среде с высоким содержанием нефти и нефтепродуктов, наличие катаболических плазмид, способность к биодеградации нефти в широком диапазоне температур, продукция биосурфактантов и устойчивость к изменениям значений pH (Табл. 36). В состав консорциума вошли следующие штаммы: *Rhodococcus erythropolis* S26, *Rhodococcus* sp. S25, *Serratia* sp.6, *Pseudomonas putida* F701, *Acinetobacter baumanni* 1B и *Acinetobacter baumanni* 7.

Табл. 36. Критерии отбора микроорганизмов для составления ассоциации – способность к росту и деградации углеводородов нефти в следующих условиях:

критерии отбора микроорганизмов	**микроорганизмы**
pH среды 5 – 8	1A, **1B**, **2A**, 2B, **6**, **7**, S25, S26 и F701
5% NaCl	1A, 1B, 2A, **2B**, 2C, 3, 4, 5, 6, 7, **X5**, X25, S25, S26, S67, **142NF** и F701
температура 2 – 42°C	1B, 6, 7, S25, S26 и F701
концентрация нефти 30% при 24°C	**1B**, **6**, 7, X25, **S25**, **S26** и **F701**
концентрация нефти 20% при 2 – 4°C	**6**, **7**, S25, **S26** и F701
концентрация дизельного топлива 30% при 24°C	**1B**, **2C**, **6**, 7, **S26** и **F701**
концентрация дизельного топлива 30% при 2 – 4°C	**1B**, 6, 7, **S26** и F701
активный продуцент биосурфактантов	1B, 7, X5, S26, S67 и F701
наличие катаболических плазмид	1B, 4, 6, 7, S26, S67, X25, S25 и F701

Примечание: жирныи щрифтом выделены штаммы, с наилучшими показателями критериев отбора

Далее, в ходе селекции смешанной культуры, состоящей из 6 отобранных штаммов S26, S25, 1B, 6, F701 и 7, в условиях периодического культивирования в жидкой минеральной среде с 15% нефти при pH среды 5 в течение 10 суток при температурах 4°C и 24°C была получена ассоциация, состоящая штаммов *Rhodococcus erythropolis* S26, *Acinetobacter baumannii* 1B, *Pseudomonas putida* F701 и *Acinetobacter baumannii* 7. Данный микробный консорциум получил название ассоциация «ВиО». Ассоциация «ВиО» способна утилизировать углеводороды нефти в диапазоне pH 4 – 10, а также деградировать высокие концентрации нефти – до 30 %.

Затем были проведены эксперименты для оценки способности ассоциации деградировать нефть (15%) в жидкой минеральной среде при различных температурах. Нефтедеградирующую активность оценивали по суммарному показателю убыли нефти в жидкой среде, определяемому методом ИК-спектрометрии. Наибольшая степень деструкции нефти наблюдалась при культивировании опытного образца биопрепарата «ВиО» при 4°C и составила 44%, при температуре 24°C – 38%. Убыль нефти в системе, изучаемой при температуре 50°C, была незначительной (около 1%) (Рис.60). Анализ остаточной концентрации нефти показал, что наибольшая скорость убыли нефти была выявлена в течение первых 15 суток эксперимента. В последующие 15 суток изменение концентрации нефти было незначительным.

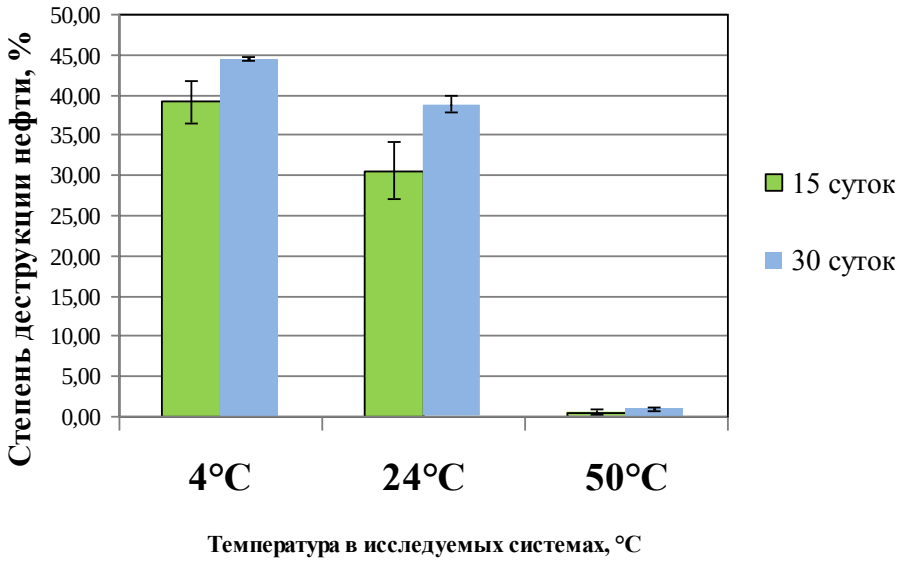
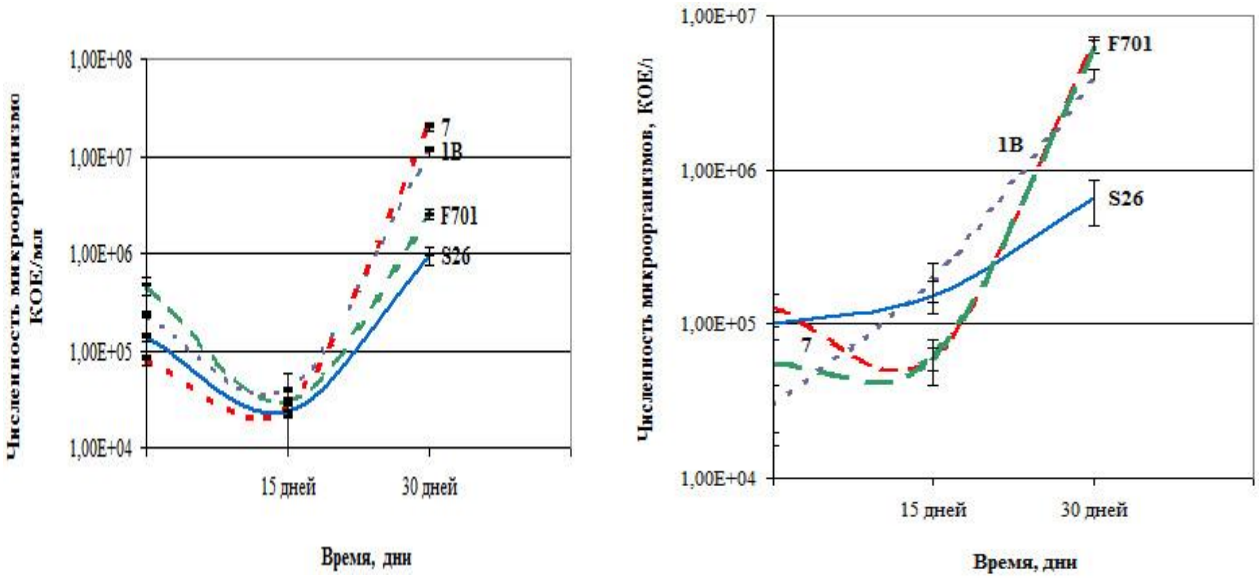


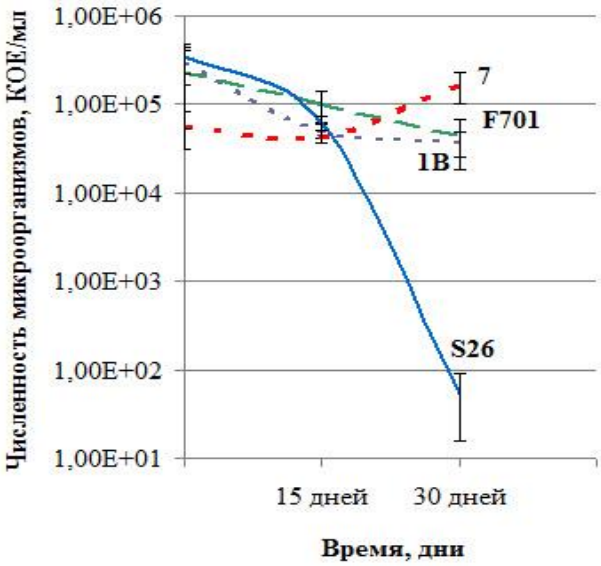
Рис. 60. Степень деструкции нефти при культивировании ассоциации «ВиО» при различных температурах в жидкой минеральной среде с 15% нефти в течение 30 дней (результаты представлены с вычетом абиотической убыли нефти при каждой температуре).

В этом эксперименте абиотическая убыль нефти в контроле при температуре 4°C составила 3% через 15 суток, 8% - через 30 суток. Абиотическая убыль загрязнителя в контроле при температуре 24°C составила 9% через 15 суток, 12% - через 30 суток.

Численность микроорганизмов в течение первых 15 суток эксперимента снизилась на 0,5 - 1 порядок (Рис. 61 А и Б). Во второй половине эксперимента в системах, культивируемых при температурах 2-4°C и 24°C, наблюдалось увеличение концентрации бактерий до 10^6 – 10^7 КОЕ/мл. Даже к концу эксперимента (30 суток) все штаммы ассоциации находились в фазе экспоненциального роста. При культивировании консорциума при температуре 50 °C наблюдалось снижение численности всех бактерий, кроме штамма 7, в течение всего эксперимента (Рис. 61 В).



А **Б**



В

Рис. 61 Динамика численности микроорганизмов при культивировании ассоциации ВиО при температурах 2-4°С (А), 24°С (Б) и 50 °С (В) в жидкой минеральной среде с 15% нефти в течение 30 дней.

Следует отметить, что бактерии *Acinetobacter baumannii* 1B, *Rhodococcus erythropolis* S26, *Acinetobacter baumannii* 7, входящих в ассоциацию «ВиО», с большой вероятностью содержат плазмиды биодеградации гексадекана, а штамм *Pseudomonas putida* F701 имеет гены биодеградации нафталина в составе конъюгативной плазмиды pF701a. (данные раздела 3.1.2). Таким образом, отобранная ассоциация плазмидосодержащих штаммов-деструкторов перспективна для очистки почвенных и

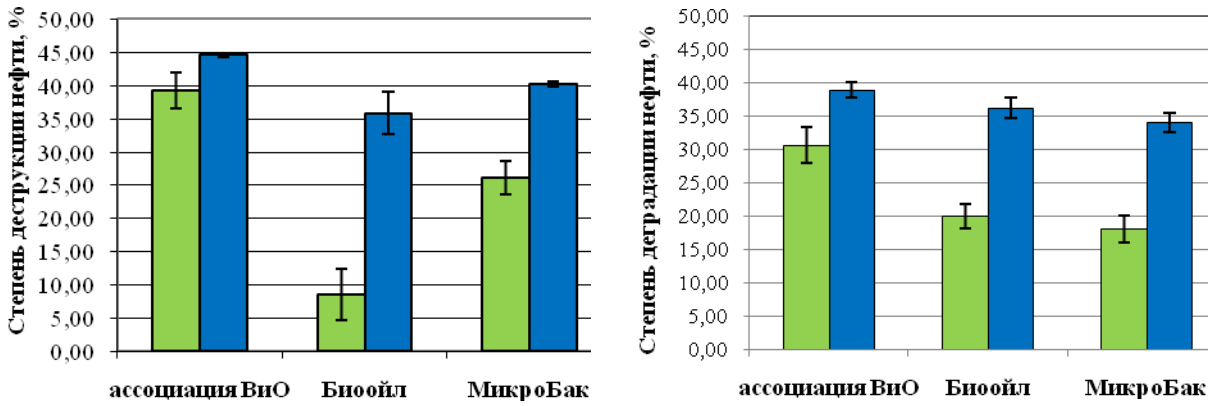
водных экосистем от загрязнения высокими концентрациями нефтепродуктов в широком температурном 4-42°С и pH 4-10 диапазонах.

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

Оценка эффективности опытных образцов биопрепаратов «ВиО» и «МикроБак» по сравнению с коммерческим биопрепаратом «Биоойл» была проведена в жидкой минеральной среде с нефтью в качестве единственного источника углерода и энергии без добавления морской соли, а также в жидкой минеральной среде с нефтью или дизельным топливом в качестве единственного источника углерода и энергии с добавлением 3% морской соли при температурах 4°С и 24 °С в течение 30 дней.

Биопрепарат «Биоойл» содержит 5 штаммов микроорганизмов-нефтедеструкторов родов *Bacillus, Sacharomyces, Acinetobacter, Enterobacter* и активно используется для ремедиации почв в северных регионах России на территории Ямало-Ненецкого Автономного округа и Западной Сибири.

На рисунке 62 представлены результаты анализа степени деструкции нефти исследуемыми биопрепаратами, полученные методом ИК-спектрометрии, в условиях культивирования в жидкой минеральной среде с 15% нефти при температурах 4°С и 24 °С в течение 30 дней.



А) при температуре 4 °С **Б)** при температуре 24 °С

Рис. 62 Степень деструкции нефти при культивировании опытных образцов биопрепаратов «ВиО», «МикроБак» и коммерческого биопрепарата «Биоойл» в жидкой минеральной среде с 15% нефти в течение 30 дней

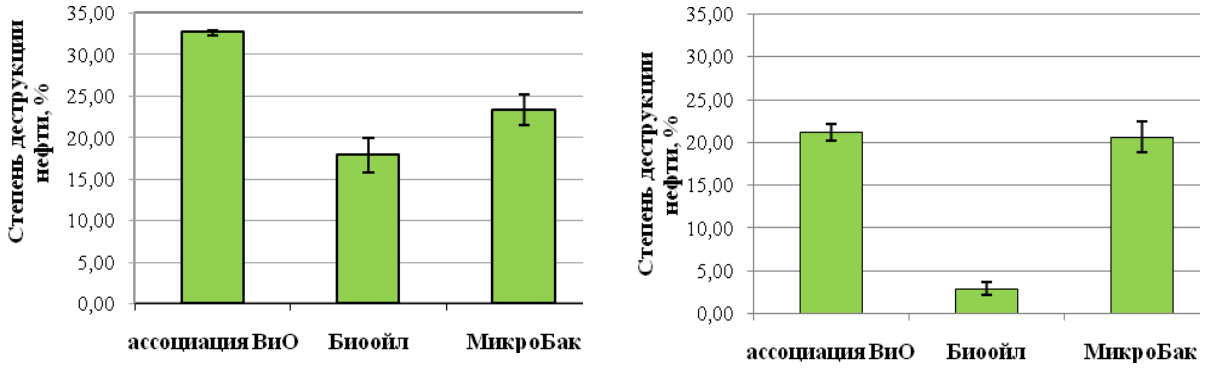
(зеленые столбцы – через 15 суток, синие столбцы – через 30 суток)
(результаты представлены с вычетом абиотической убыли нефти при каждой температуре)

Как видно из данных рисунка 62 наибольшая убыль нефти наблюдалась при культивировании препарата «ВиО» – 45 % при 4°С , - 39% при 24°С. Для препарата «МикроБак» и «Биоойл» эти показатели были ниже и составили при температуре 4°С - 40% и 36%, соответственно, а при температуре 24°С -34% и 36%. Следует отметить, что при низкой температуре использование биопрепаратов «ВиО» и «МикроБак» приводило к значительной утилизации углеводородов нефти в первые 15 суток - 39% и 26%. Величина степени деструкции в системах, интродуированных биопрепаратом «Биоойл», было незначительным - 8% через 15 дней, а в последующие 15 суток этот параметр достиг показателя 36%. (Рис. 62А). При температуре 24°С наибольшая убыль углеводородов нефти наблюдалась при использовании биопрепарата «ВиО»– через 15 суток 31%, через 30 суток – 39% (Рис. 62Б). Препараты ВиО и МикроБак более эффективны при низких температурах по сравнению с биопрепаратом Биоойл, при температуре 24°С эффективность препаратов сравнима между собой.

Анализ динамики численности микроорганизмов, входящих в состав ассоциации ВиО и биопрепаратов «Биоойл» и «МикроБак», при культивировании в жидкой минеральной среде с 15% нефти при 24 °С в течение 30 дней показал, что максимальная численность почти всех микроорганизмов в составе биопрепарата «МикроБак» была достигнута уже через 15 суток (1×10^6 КОЕ/мл), тогда как практически все штаммы бактерий, входящие в состав биопрепаратов «Биоойл» и «ВиО», даже к концу эксперимента (30 суток) находились в фазе экспоненциального роста (2×10^6 - 8×10^6 КОЕ/мл).

Добавление в ростовую среду 3% морской соли привело к снижению эффективности процесса деградации нефти при использовании всех трех образцов биопрепаратов (Рис. 63). При использовании препарата «ВиО» убыль нефти после 30 дней культивирования составила 33% при температуре 4°С (без соли 44%) и 22% при температуре 24°С (без соли 39%). Аналогичная картина наблюдалась при использовании биопрепаратов «Биоойл» и «МикроБак». Наименьшая убыль нефти наблюдалась при использовании биопрепарата «Биоойл»- 18% и 3% при температурах 4°С и 24°С, соответственно. Данные Рис. 63 демонстрируют, что применение препаратов «ВиО» и «МикроБак» более эффективно по сравнению с препаратом

«Биоойл» в условиях повышенной солености как при пониженной (4°С), так и при нормальной температуре 24°С .



А) при температуре 4 °С **Б)** при температуре 24 °С

Рис. 63 Степень деструкции нефти при культивировании биопрепаратов «ВиО», «МикроБак» и «Биоойл» в жидкой минеральной среде с 15% нефти в присутствии 3 % морской соли в течение 30 дней

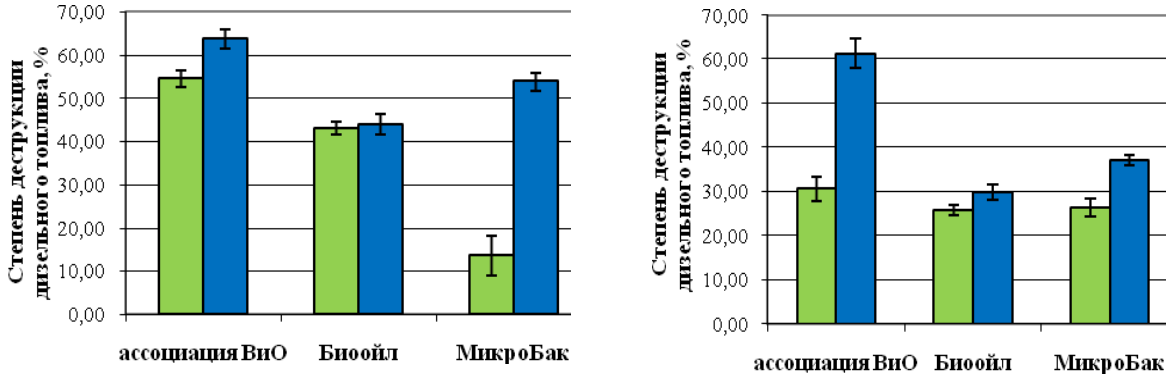
(результаты представлены с вычетом абиотической убыли нефти при каждой температуре)

Исследование динамики численности микроорганизмов, входящих в состав препарата «ВиО» показало, что через 30 суток их численность при 4°С снизилась на 0,5 порядка по сравнению с исходной концентрацией (10^7 КОЕ/мл). В случае биопрепарата «Биоойл» наблюдалось следующее: штаммы родов *Acinetobacter* и *Bacillus* увеличили свою концентрацию на 0,5 порядка, а остальные – снизили свою концентрацию на 0,5-1 порядок по сравнению с исходной концентрацией (10^7 КОЕ/мл). Анализ данных, полученных для биопрепарата «МикроБак», показал, что концентрация бактерий рода *Pseudomonas* – увеличилась на 1-1,5 порядка, бактерий рода *Rhodococcus* – уменьшилась в 10 раз по сравнению с исходной концентрацией (10^7 КОЕ/мл).

При оценке численности микроорганизмов в процессе культивирования в жидкой минеральной среде с 15% нефти и 3 % морской соли при 24°С в течение 30 дней было отмечено, что численность штаммов, входящих в биопрепарат «МикроБак», практически не изменилась (10^7 КОЕ/мл); концентрация всех бактерий-деструкторов биопрепарата «ВиО» снизилась незначительно (8×10^6 КОЕ/мл). В случае биопрепарата «Биоойл» наблюдалось увеличение концентрации штаммов

Acinetobacter и *Bacillus* на 1 порядок (до 10^6 КОЕ/мл), а численность микроорганизмов *Enterobacter* снизилась на 2 порядка (данные не представлены).

При проведении экспериментов в жидкой минеральной среде с добавлением 15% дизельного топлива и 3% морской соли при температуре 4 °С (Рис. 64А) через 30 дней степень деструкции была выше по сравнению со средой с нефтью и достигла 64 % для препарата «ВиО», тогда как этот показатель для биопрепаратов «Биоойл» и «МикроБак» составил - 44% и 54 % соответственно.



А) при температуре 4 °С **Б)** при температуре 24 °С

Рис. 64 Степень деструкции дизельного топлива при культивировании ассоциации ВиО и биопрепаратов «Биоойл» и «МикроБак» в жидкой минеральной среде с 15% дизельного топлива и 3 % морской соли в течение 30 дней
(зеленые столбцы – через 15 суток, синие столбцы – через 30 суток)
(результаты представлены с вычетом абиотической убыли дизельного топлива при каждой температуре)

Следует отметить, что наибольшая убыль загрязнителя в системах, инокулированных биопрепаратами «Биоойл» и «ВиО», была отмечена уже в первые 15 суток эксперимента. Анализ динамики численности микроорганизмов, входящих в состав биопрепарата «Биоойл», показал, что через 15 суток началось снижение концентрации клеток бактерий (до 10^6 КОЕ/мл) и в дальнейшем продолжалось уменьшение титра клеток еще на 0,5 порядка. В то время как численность практически всех штаммов «ВиО» увеличилась почти на 1 порядок к 30 суткам культивирования (до 10^8 КОЕ/мл) по сравнению с 15 сутками эксперимента (10^7 КОЕ/мл). Анализ данных, полученных для биопрепарата «МикроБак» через 15 суток, показал, что концентрация бактерий рода *Pseudomonas* увеличилась на 0,5 порядка, а бактерий рода *Rhodococcus* уменьшилась на порядок по сравнению с исходной концентрацией (10^7 КОЕ/мл).

При температуре 24 °С по результатам ИК-спектрометрии степень деградации дизельного топлива ассоциацией «ВиО» на 15 сутки составляла 31%, а на 30 сутки увеличилась ещё на 30% и составила 61% (Рис. 64Б). Значения степени деструкции через 15 и 30 суток для биопрепаратов «Биоойл» и «МикроБак» мало изменились и составили примерно 30 и 37% соответственно на 30 сутки. Исследование динамики численности микроорганизмов, входящих в состав биопрепарата «МикроБак», показало, что через 15 суток культивирования в жидкой минеральной среде с 15% дизельного топлива и 3 % морской соли при 24 °С начиналось снижение концентрации клеток бактерий (до 10^6 КОЕ/мл). В случае ассоциации «ВиО» на 15 сутки у всех штаммов, кроме S26, наблюдалось увеличение численности клеток на 0,5 порядка (до 5×10^7 КОЕ/мл). У микроорганизмов в составе биопрепарата «Биоойл» динамика численности изменялась следующим образом: наблюдался рост штамма *Acinetobacter* через 15 суток культивирования (6×10^7 КОЕ/мл), у штамма *Bacillus* через 15 суток началось снижение концентрации клеток (7×10^6 КОЕ/мл), а остальные бактерии практически не изменили свою численность в течение эксперимента.

Можно отметить, что при культивировании всех биопрепаратов в жидкой минеральной среде с дизельным топливом с добавлением соли наибольшая эффективность деградации наблюдалась при низкой температуре. Наиболее эффективным оказался опытный образец биопрепарата «ВиО» как при низкой температуре (убыль нефти 64%), так и при 24 °С (убыль нефти 61%).

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

Оценка эффективности отобранной ассоциации «ВиО» по сравнению с биопрепаратами «Биоойл» и «МикроБак» также была проведена в модельных нестерильных почвенных системах, загрязненных 2% нефти. Вклад аборигенных микроорганизмов в деградацию углеводородов оценивали по убыли нефти в модельной нестерильной почвенной системе (микрокосм 1), а также в микрокосме 2, где деградация нефти аборигенными микроорганизмами стимулировалась за счет внесения минеральных удобрений. Исследование степени деструкции нефти и популяционной динамики интродуцированных и аборигенных микроорганизмов проводили в микрокосме 3 (почва, загрязненная нефтью с добавлением нитроаммофоски и биопрепарата «МикроБак»), микрокосме 4 (почва, загрязненная

нефтью с добавлением нитроаммофоски и биопрепарата «Биоойл»), и микрокосме 5 (почва, загрязненная нефтью с добавлением нитроаммофоски и ассоциации «ВиО»).

Большинство работ по восстановлению нефтезагрязненных территорий проводится в летний период и включает рыхление почвы для увеличения доступа кислорода и дополнительное увлажнение, повышающее транспорт питательных веществ к клеткам микроорганизмов. Поэтому лабораторный эксперимент проводили при комнатной температуре (18 – 25 ˚С) в течение 42 суток, при этом были созданы благоприятные условия для роста и развития микроорганизмов за счет внесения минеральных удобрений (нитроаммофоски), рыхления и поддержания постоянной влажности на уровне 25%.

Табл. 37. Убыль нефти в модельных системах с 2% нефти через 42 дня.

Микрокосмы		**Убыль нефти, %**
1	Контроль без внесенных микроорганизмов и нитроаммофоски	22,83±3,25
2	Контроль без внесенных микроорганизмов + нитроаммофоска	30,59±2,53
3	«МикроБак» + нитроаммофоска	51,23±4,26
4	«Биоойл» + нитроаммофоска	44,48±2,51
5	Ассоциация «ВиО» + нитроаммофоска	58,71±1,59

Анализ данных таблицы 37 показывает, что внесение препарата «ВиО» в модельные нестерильные почвенные системы обеспечило наиболее эффективную деградацию нефти 58,7% по сравнению с системами, инокулированными препаратами «Биоойл» и «МикроБак», 44,5% и 51,2% соответственно. Следует отметить, что внесение дополнительных биогенных элементов (источник азота, фосфора и калия) в виде минеральных удобрений – нитроаммофоски, также повышало эффективность деградации нефти (Табл.37).

На рисунке 65 представлены кривые роста микроорганизмов, входящих в препарат «ВиО», в модельной почвенной системе с нефтью. Максимум численности практически всех штаммов, кроме *Acinetobacter baumannii* 7, был достигнут через 28 дней. Следует отметить, что численность штамма *Acinetobacter baumannii* 7 даже к концу эксперимента продолжала увеличиваться.

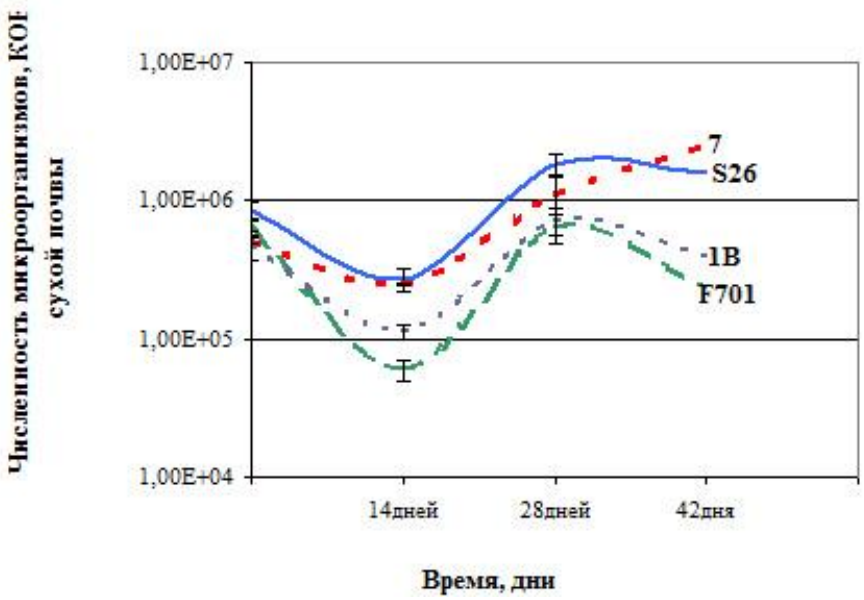


Рис. 65 Динамика численности микроорганизмов ассоциации «ВиО» в модельных почвенных нестерильных системах, загрязненных 20г нефти/кг почвы.

Анализ данных рисунка 66 показал, что внесение минеральных удобрений способствует приросту общей численности нефтедеструкторов. Максимальный прирост биомассы нефтедеструкторов был достигнут к 28 дню от начала проведения эксперимента. Наблюдалось увеличение общей численности нефтедеструкторов на 1 порядок в модельных системах, содержащих биопрепараты, за счет физиологической и метаболической активности интродуцированных штаммов-деструкторов.

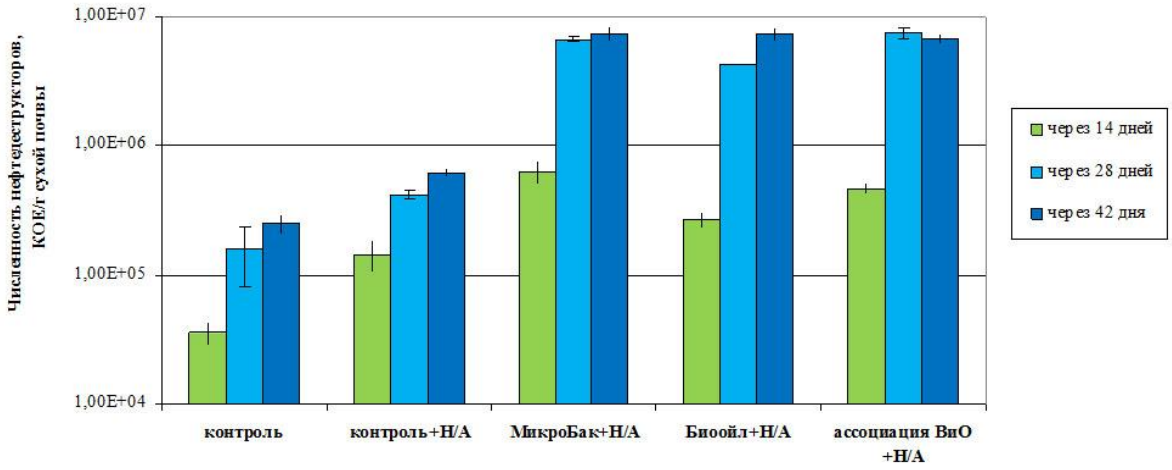


Рис. 66 Изменение численности нефтедеструкторов в микрокосмах в течение 42 дней.

** Н/А - нитроаммофоска*

3.8 Раздельное и совместное культивирование микроорганизмов-нефтедеструкторов

Одним из важных этапов при разработке биопрепаратов для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений является получение биомассы штаммов-деструкторов в промышленных масштабах. Для этого необходимо подобрать соответствующие питательные среды и оптимизировать условия культивирования микроорганизмов.

Ферментации микроорганизмов-нефтедеструкторов *P. fluorescens* 142NF и *Rhodococcus* sp. S67 проводили в периодическом режиме в ферментерах объемом 10 л с коэффициентом заполнения 0,6. В состав питательной среды входили следующие компоненты: кислотный гидролизат казеина, дрожжевой автолизат, глюкоза и набор минеральных солей (см. п. 2.14). При выращивании псевдомонад на стадии экспоненциального роста дополнительно вносили стимулирующие добавки: в одном случае салицилат натрия, в другом – дизельное топливо (ДТ). При культивировании родококков также добавляли ДТ.

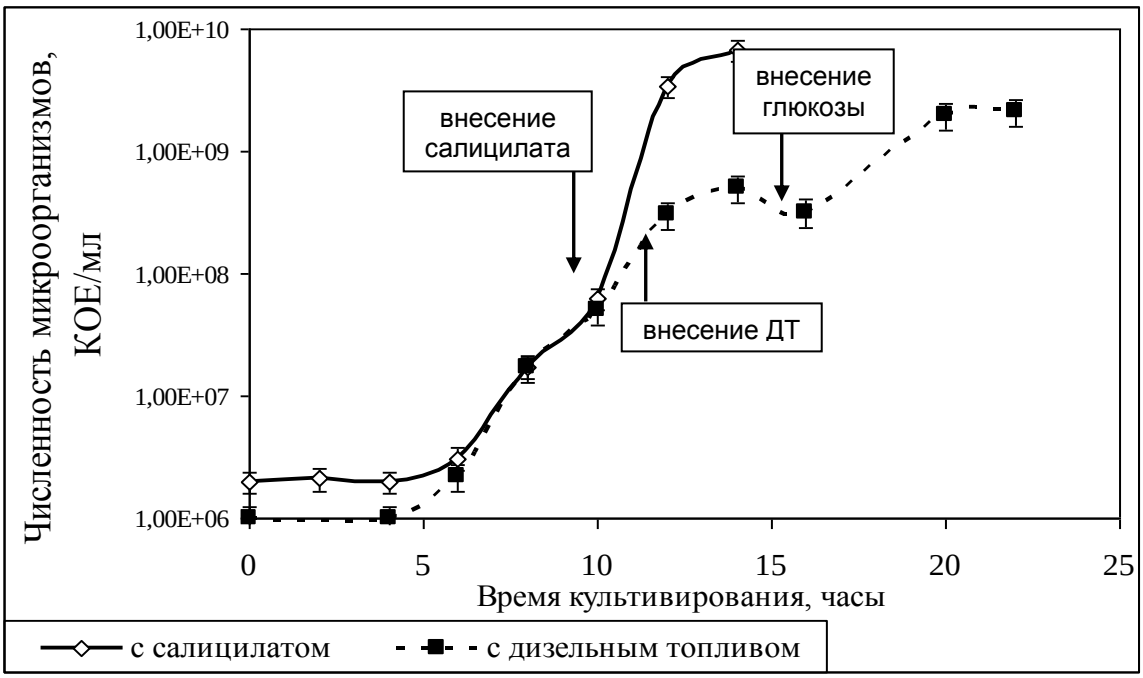


Рис. 67 Динамика численности микроорганизмов P. fluorescens 142NF при ферментации в монокультуре с различными добавками.

Как видно из рис. 67, динамика роста микроорганизмов штамма *P. fluorescens* 142NF в первые 10 часов практически одинакова для первой и второй ферментации. Лаг-фаза составляет 4 часа. За этот период увеличения численности микроорганизмов не наблюдается. После начинается ускорение роста с 4 до 6 часов и

переход в экспоненциальную фазу. При этом удельные скорости роста на отрезке с 8 до 10 часов практически одинаковы: 0,75 $ч^{-1}$ и 0,78 $ч^{-1}$ (для интервала от 8 до 10 ч.). Однако после добавления в культуральную среду салицилата на 10 ч. скорость роста возросла до 1,9 $ч^{-1}$ (10–12 ч.), о чём свидетельствует быстрое увеличение численности микроорганизмов. Для ферментации с ДТ величина данного параметра к этому времени составила лишь 0,9 $ч^{-1}$ (10–12 ч.), а численность микроорганизмов – $3{,}0\times10^8$ КОЕ/мл, что на порядок ниже, чем после внесения салицилата ($3{,}4\times10^9$ КОЕ/мл). После же добавления ДТ, скорость роста снизилась до 0,26 $ч^{-1}$ (12–14 ч.), а к 16 ч. наблюдалась даже гибель бактерий. Для поддержания роста была сделана добавка глюкозы, в результате чего плотность биомассы возросла до 2×10^9 КОЕ/мл при удельной скорости роста 0,46 $ч^{-1}$ (16–20 ч.). Ферментации останавливали на различных стадиях роста: для процесса с внесением салицилата – при переходе культуры в фазу замедления роста на 14 ч. роста; для процесса с добавлением ДТ и глюкозы – в стационарной фазе на 24 ч.. В результате численность микроорганизмов в культуральной жидкости в конце культивирования с салицилатом была почти в 3 раза больше ($6{,}7\times10^9$ и $2{,}1\times10^9$ КОЕ/мл соответственно), а общая продолжительность процесса – почти в 2 раза меньше (14 и 24 ч. соответственно), чем при ферментации с добавлением ДТ. После сепарирования культуральной жидкости полученной при культивировании с добавлением салицилата, получили 160 г биомассы с численностью микроорганизмов в концентрированной суспензии $4{,}2\times10^{10}$ КОЕ/г, а с добавлением ДТ – 136 г биомассы, а численность микроорганизмов составила $1{,}1\times10^{11}$ КОЕ/г.

При ферментации микроорганизмов штамма *Rhodococcus* sp. S67 (рис. 68) лаг-фаза составила 8 часов, что в 2 раза больше, чем у псевдомонад. Период экспоненциального роста продолжался с 10 до 22 ч. – всего 12 ч.. При этом максимальная удельная скорость роста составила 0,51 $ч^{-1}$ (12–22 ч.). Культивирование прекращали сразу после перехода культуры микроорганизмов в фазу замедления роста. Общее время проведения ферментации составило 24 ч. В результате после сепарации получили 200 г биомассы с численностью микроорганизмов $1{,}3\times10^{11}$ КОЕ/г в концентрированной суспензии.

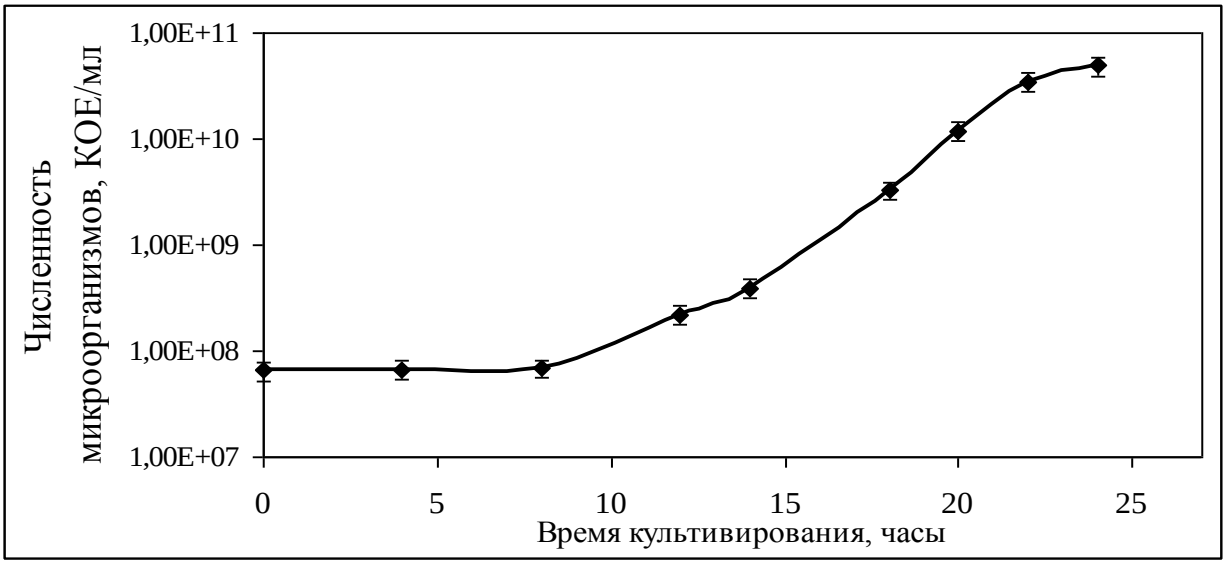


Рис. 68 Динамика численности микроорганизмов Rhodococcus sp. S67 при ферментации в монокультуре.

При проведении совместной ферментации микроорганизмов засев штамма *P. fluorescens* 142NF производился через определённое время (12 ч.) после начала культивирования микроорганизмов штамма *Rhodococcus* sp. S67, соответствующее экспоненциальной фазе роста родококков. Это позволило компенсировать разницу в скоростях роста этих двух микроорганизмов.

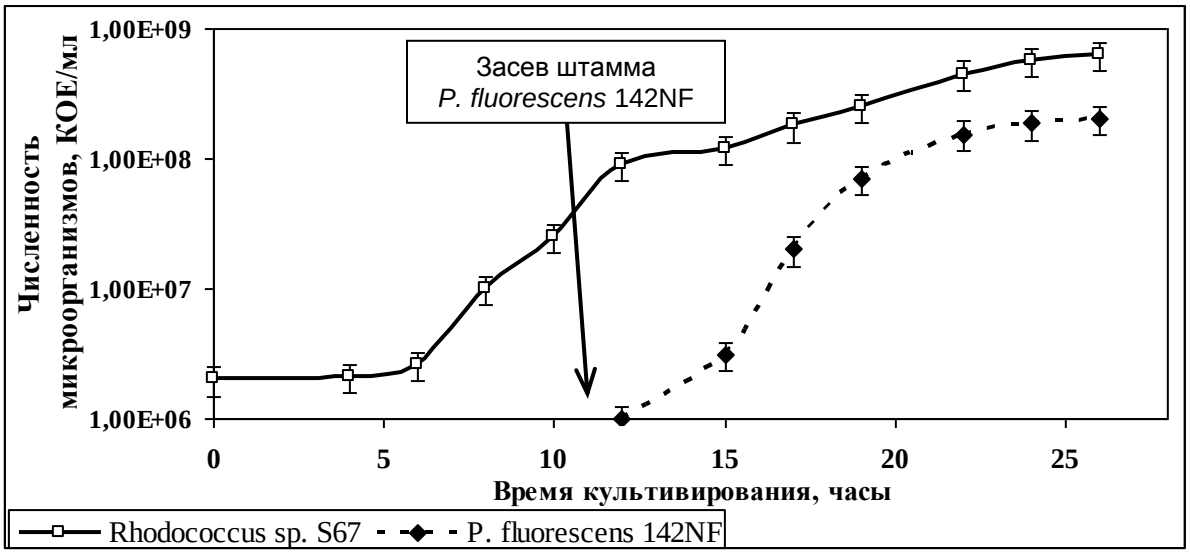


Рис. 69 Динамика численности микроорганизмов штаммов Rhodococcus sp. S67 и P. fluorescens 142NF при их совместной ферментации.

Из представленных на рис. 69 данных видно, что до инокуляции культуры псевдомонад динамика роста родококков аналогична представленной на рис. 68. Переход в экспоненциальную фаза роста начинается на участке от 6 до 8 часов, а

скорость роста бактерий составила 0,6 $ч^{-1}$ (8–12 ч.). Внесение псевдомонад производили на 12 часу проведения процесса. При этом сразу произошло значительное снижение удельной скорости роста родококков: до 0,1 $ч^{-1}$ (12–15 ч.). Однако с 15 часа скорость роста родококков несколько увеличивается до 0,2 $ч^{-1}$, в результате чего их общая численность от момента внесения псевдомонад до конца процесса возросла почти в 10 раз (с 9×10^7 до 6×10^8 КОЕ/мл). Удельная скорость роста псевдомонад при росте в смешанной культуре так же ниже, чем в монокультуре: 0,6 $ч^{-1}$ (12–19 ч.), но при этом отсутствует лаг-фаза. Достижение стационарной фазы роста произошло одновременно для обоих микроорганизмов при близкой численности, что оптимально для использования в биопрепарате.

По основным показателям (табл. 38) совместная ферментация почти не уступает раздельным, а её преимущества очевидны: число большинства необходимых технологических операций сокращается почти в два раза. Таким образом, для получения биопрепаратов на основе исследуемых штаммов-нефтедеструкторов целесообразно применять совместное культивирование.

Табл. 38. Сравнение основных характеристик микроорганизмов P. fluorescens 142NF и Rhodococcus sp. S67 при ферментации в монокультуре и в смешанной культуре.

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

[1)] — *P. fluorescens* 142NF; [2)] — *Rhodococcus* sp. S67

В результате совместного культивирования двух микроорганизмов получено 208 г биомассы с численностью родококков $3,8\times10^{10}$ КОЕ/г и псевдомонад – $3,4\times10^{10}$ КОЕ/г в концентрированной суспензии. Общее время совместной ферментации составило 26 часов, что является непродолжительным и экономически выгодным.

После каждого культивирования микроорганизмы проверяли на сохранение способности к окислению нефтепродуктов путём высева на минимальные среды,

содержащие нефть, ДТ, нафталин, салицилат или гексадекан в качестве единственного источника углерода и энергии. Во всех случаях было отмечено 100% сохранение способности к деградации указанных субстратов.

3.9 Получение различных форм микробной биомассы и её хранение. Сохранение жизнеспособности и деградативной активности микроорганизмов, входящих в состав биопрепаратов.

3.9.1 Кратковременное хранение микроорганизмов-нефтедеструкторов в жидкой форме

Важнейшими задачами при хранении микроорганизмов-нефтедеструкторов являются сохранение их высокой жизнеспособности и деградативных свойств, т.е. способности разлагать различные углеводороды нефти.

Хранение проводили в различных вариантах (рис. 70) Для сравнения действия различных консервантов на сохранение жизнеспособности микроорганизмов концентрированную суспензию, полученную при культивировании в ферментёрах (как описано в п. 2.14), помещали на хранение при температуре 2-4°С. В качестве консервирующих агентов использовали сахарозу, глутамат натрия или бензоат натрия. Помимо того, концентрированную суспензию хранили в разбавленном виде с фосфатным буфером. В качестве контроля использовали биомассу микроорганизмов в нативной форме без добавок.

Концентрированную суспензию биомассы микроорганизмов, полученную при культивировании штамма *P. fluorescens* 142NF с добавлением салицилата хранили в нативном виде, в разбавленном фосфатном буфере и с добавлением 20% раствора сахарозы. Хранение биомассы, полученной культивированием с добавлением ДТ, осуществляли в нативной форме и с добавлением консервантов: 0,2% раствора бензоата натрия или 0,2% раствора глутамата натрия. При этом из данных по динамике роста этих культур (рис. 69) известно, что в первом случае биомасса микроорганизмов находилась в предстационарной фазе роста, а во втором – в стационарной. Концентрированную суспензию родококков, полученную при глубинном культивировании в ферментёре, хранили всеми пятью способами: с глутаматом, с бензоатом, с сахарозой, разбавленную буфером и в нативной форме.

Как видно из полученных данных (табл. 39-40), в концентрированной суспензии псевдомонад, выращенных с ДТ до стационарной фазы, наблюдаются лучшие показатели по сохранению численности живых клеток, чем в случае биомассы

псевдомонад, выращенных с салицилатом до фазы замедления роста. В контроле через 14 дней этот показатель в 3 раза выше.

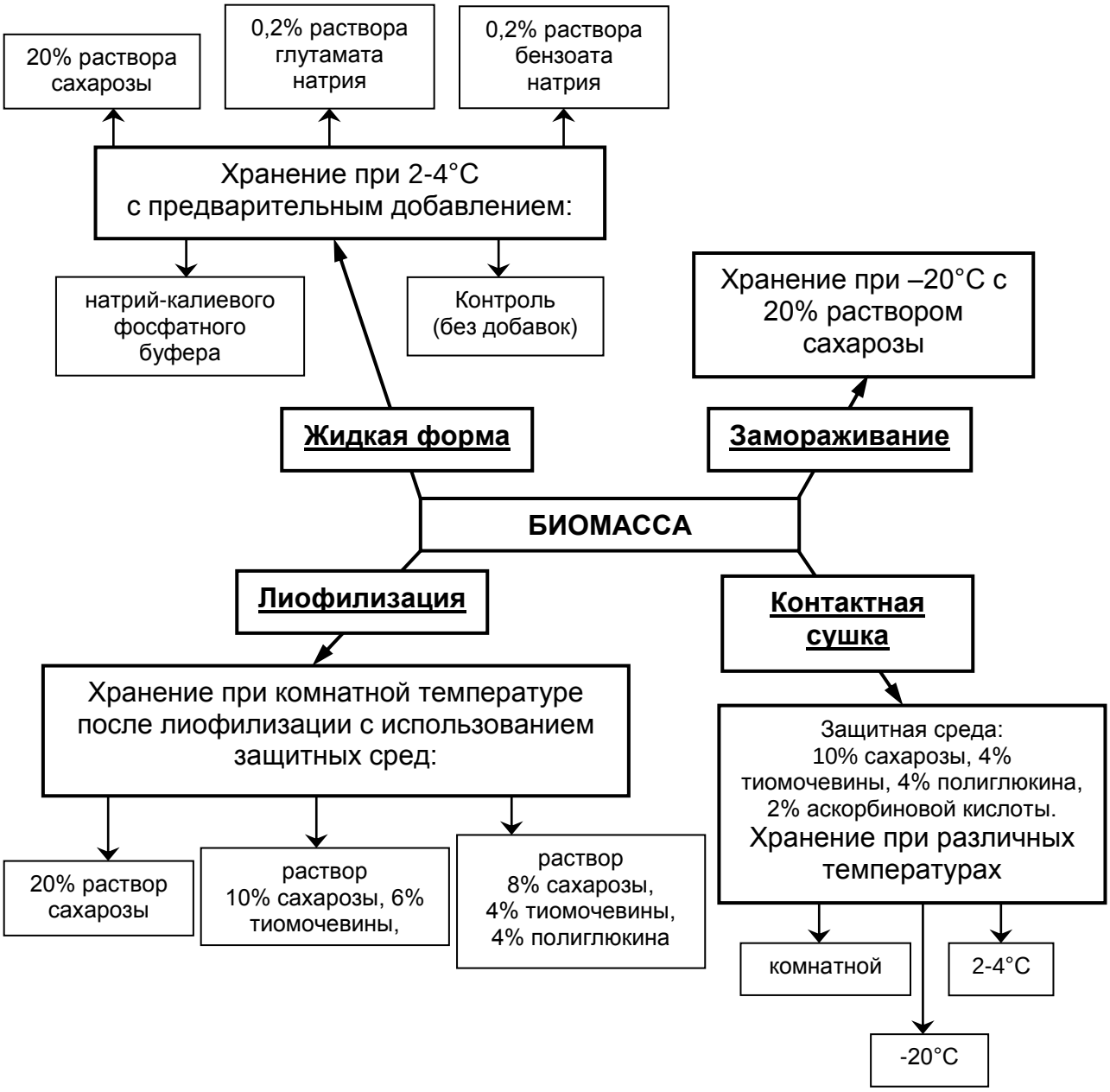


Рис. 70 Схема эксперимента по хранению микроорганизмов.

Полученные результаты говорят о том, что максимальная выживаемость была достигнута при использовании 0,2% раствора бензоата натрия в качестве консерванта как при хранении бактерий штамма *P. fluorescens* 142NF, так и *Rhodococcus* sp. S67 (табл. 39-41). В этом варианте наблюдался наибольший процент выживших клеток для всех проверенных точек. Так для псевдомонад численность жизнеспособных микроорганизмов с этим консервантом через два месяца составила $1{,}9\times10^{8}$ КОЕ/мл (в

контроле – $9{,}0\times10^7$), а для родококков – $3{,}9\times10^{10}$ КОЕ/мл (в контроле – $1{,}2\times10^{10}$ КОЕ\мл). Близкие показатели численности бактерий к концу этого же срока были получены и в случае использования 0,2% раствора глутамата натрия: $1{,}6\times10^8$ КОЕ/мл для псевдомонад и $3{,}7\times10^{10}$ КОЕ/мл для родококков, хотя в течение первых двух недель хранения численность псевдомонад с этим консервантом была даже ниже, чем в контроле: $2{,}6\times10^{10}$ КОЕ/мл и $4{,}3\times10^{10}$ КОЕ/мл, соответственно. Родококки при хранении с глутаматом натрия на протяжении всего времени демонстрировали численность, очень близкую к варианту с бензоатом натрия. Применение сахарозы оказалось самым неэффективным: во всех случаях численность в этом варианте была ниже, чем в контроле.

Из полученных данных видно, что микроорганизмы *Rhodococcus* sp. S67 хранятся лучше *P. fluorescens* 142NF. Во всех составленных вариантах хранения численность родококков превышала численность псевдомонад в соответствующем варианте за весь изученный период. Так, за месяц хранения количество жизнеспособных клеток родококков в контроле снизилось в 3 раза, а псевдомонад – в 50 раз.

Таким образом, хранение родококков можно осуществлять в течение более длительного времени, чем хранение псевдомонад. При краткосрочном хранении (до 8 недель) наилучшее сохранение численности жизнеспособных клеток микроорганизмов достигается при использовании 0,2% раствора бензоата натрия в качестве консерванта.

Табл. 39. Численность жизнеспособных микроорганизмов штамма P. fluorescens 142NF (фаза замедления роста) при хранении в жидкой форме (КОЕ/мг).

Время хранения, недели	Тип хранения		
	Контроль	Биомасса с фосфатным буфером	Биомасса с 20% сахарозой
0	$(4{,}2\pm0{,}6)\times10^{10}$		
1	$(2{,}9\pm0{,}4)\times10^{10}$	$(2{,}9\pm0{,}6)\times10^{10}$	$(0{,}9\pm0{,}01)\times10^{10}$
2	$(5{,}1\pm0{,}5)\times10^{9}$	$(13\pm4)\times10^{9}$	$(0{,}23\pm0{,}04)\times10^{9}$
4	$(1{,}8\pm0{,}3)\times10^{8}$	$(2{,}0\pm0{,}5)\times10^{8}$	$(0{,}11\pm0{,}03)\times10^{8}$
8	$(2{,}8\pm0{,}4)\times10^{6}$	$(4{,}0\pm0{,}3)\times10^{6}$	$(0{,}38\pm0{,}03)\times10^{6}$

Табл. 40. Численность жизнеспособных микроорганизмов штамма P. fluorescens 142NF (стационарная фаза) при хранении в жидкой форме (КОЕ/мг).

Время хранения, недели	Тип хранения		
	Контроль	Биомасса с 0,2% бензоатом натрия	Биомасса с 0,2% глутаматом натрия
0	$(1,1\pm0,2)\times10^{11}$		
1	$(8,9\pm0,9)\times10^{10}$	$(9,0\pm0,8)\times10^{10}$	$(7,3\pm0,8)\times10^{10}$
2	$(4,3\pm0,4)\times10^{10}$	$(4,7\pm0,5)\times10^{10}$	$(2,6\pm0,3)\times10^{10}$
4	$(2,0\pm0,3)\times10^{9}$	$(4,0\pm0,3)\times10^{9}$	$(3,0\pm0,4)\times10^{9}$
8	$(0,9\pm0,07)\times10^{8}$	$(1,9\pm0,3)\times10^{8}$	$(1,6\pm0,2)\times10^{8}$

Табл. 41. Численность жизнеспособных микроорганизмов штамма Rhodococcus sp. S67 при хранении в жидкой форме (КОЕ/мг).

Время хранения, недели	Тип хранения				
	Контроль	Биомасса с фосфатным буфером	Биомасса с 20% сахарозой	Биомасса с 0,2% бензоатом натрия	Биомасса с 0,2% глутаматом натрия
0	$(13\pm3)\times10^{11}$				
1	$(6,4\pm0,5)\times10^{11}$	$(7,0\pm0,6)\times10^{11}$	$(5,3\pm0,6)\times10^{11}$	$(12\pm3)\times10^{11}$	$(11\pm1)\times10^{11}$
2	$(5,2\pm0,4)\times10^{11}$	$(4,3\pm0,3)\times10^{11}$	$(3,1\pm0,5)\times10^{11}$	$(8,6\pm0,8)\times10^{11}$	$(7,6\pm0,8)\times10^{11}$
4	$(4,5\pm0,5)\times10^{11}$	$(2,5\pm0,6)\times10^{11}$	$(0,23\pm0,04)\times10^{11}$	$(6,3\pm0,6)\times10^{11}$	$(6,2\pm0,8)\times10^{11}$
8	$(1,2\pm0,2)\times10^{10}$	$(2,5\pm0,4)\times10^{10}$	$(0,63\pm0,06)\times10^{10}$	$(3,9\pm0,4)\times10^{10}$	$(3,7\pm0,5)\times10^{10}$

3.9.2 Длительное хранение микроорганизмов-нефтедеструкторов

Для длительного хранения биомассы микроорганизмов использовали следующие способы (рис. 70): хранение концентрированной суспензии в замороженном виде, лиофилизация с различными защитными средами и последующим хранением при комнатной температуре, высушивание на носителе (контактная сушка) с последующим хранением при различных температурах.

Концентрированную суспензию замораживали при -20°С, предварительно добавив криопротектор (в соотношении 1:1): 20% раствор сахарозы. Хранение

осуществляли при той же температуре. Проверка количества жизнеспособных микроорганизмов через 2 месяца показала, что для всех трёх изученных образцов исходных концентрированных суспензий хранение в таких условиях позволяет сохранить большее число живых клеток по сравнению с хранением в жидкой форме при 2-4°С (табл. 42). При этом качественное соотношение численностей бактерий между вариантами сохранилось:

– выживаемость родококков вновь оказалась значительно выше, чем псевдомонад;

– выживаемость культуры псевдомонад, полученной в стационарной фазе роста, выше, чем у полученной в фазе замедления.

Процесс лиофилизации оказывает сильное повреждающее воздействие, приводящее к гибели клеток, поэтому лиофилизацию микроорганизмов проводили с использованием различных вариантов защитных сред (п. 2.16.1): сахароза; сахароза и тиомочевина; сахароза, тиомочевина и полиглюкин. Образцы хранили при комнатной температуре.

Эффективность защитных растворов и способность микроорганизмов переносить сублимационное высушивание оценивали по проценту жизнеспособных клеток в сухом материале сразу после высушивания. Для этого в биомассе, полученной глубинным культивированием (п. 2.14), определяли число КОЕ. Затем биомассу сушили по описанным выше методикам и определяли число КОЕ сразу после сушки.

Табл. 42. Численность микроорганизмов и их выживаемость после хранения в замороженном виде.

Штамм	Исходная численность микроорганизмов, КОЕ/мл	Численность через два месяца хранения при -20°С, КОЕ/мл	Выживаемость, %
P. fluorescens 142NF (с салицилатом – фаза замедления роста)	$(4,2\pm0,6)\times10^{10}$	$(0,11\pm0,02)\times10^{10}$	3
P. fluorescens 142NF (с ДТ – стационарная фаза)	$(0,11\pm0,02)\times10^{10}$	$(0,69\pm0,06)\times10^{10}$	6
Rhodococcus sp. S67	$(1,3\pm0,3)\times10^{12}$	$(0,50\pm0,06)\times10^{12}$	39

Как видно из представленных на рис. 71 данных, максимальная выживаемость после лиофилизации концентрированной суспензии штамма *P. fluorescens* 142NF, достигнутая при использовании раствора сахарозы, оказалась в 6,5 и в 13,5 раза выше по сравнению с вариантами «сахароза+тиомочевина+полиглюкин» и «сахароза+тиомочевина», соответственно. Отношение выживаемости микроорганизмов штамма *Rhodococcus* sp. S67 в варианте «сахароза+тиомочевина+полиглюкин», для которого было отмечено наиболее сильное защитное воздействие на клетки родококков, к выживаемости в двух остальных вариантах значительно ниже: 1,3 и в 4 раза. При этом использование защитной среды «сахароза+тиомочевина» было наименее эффективным для обоих микроорганизмов. Выживаемость родококков при лиофилизации оказалась выше выживаемости псевдомонад с соответствующей защитной средой.

Численность жизнеспособных микроорганизмов в сухом материале проверяли через 1, 2 и 6 месяцев хранения при комнатной температуре. Как видно из сравнения полученных результатов (табл. 43-44), в первый месяц численность псевдомонад снизилась в 2,6-3,7 раз, так что их скорость гибели была ниже, чем у родококков (5,9-16,6). Однако через два месяца процент жизнеспособных родококков опять оказался выше, как и через полгода. За шесть месяцев хранения количество микроорганизмов в лучших вариантах снизилось примерно на три порядка. Максимальная численность бактерий штамма *P. fluorescens* 142NF наблюдалась в варианте с сахарозой (1,2×107

КОЕ/мг), а *Rhodococcus* sp. S67 – в варианте «сахароза+тиомочевина +полиглюкин» (1,7×109 КОЕ/мг).

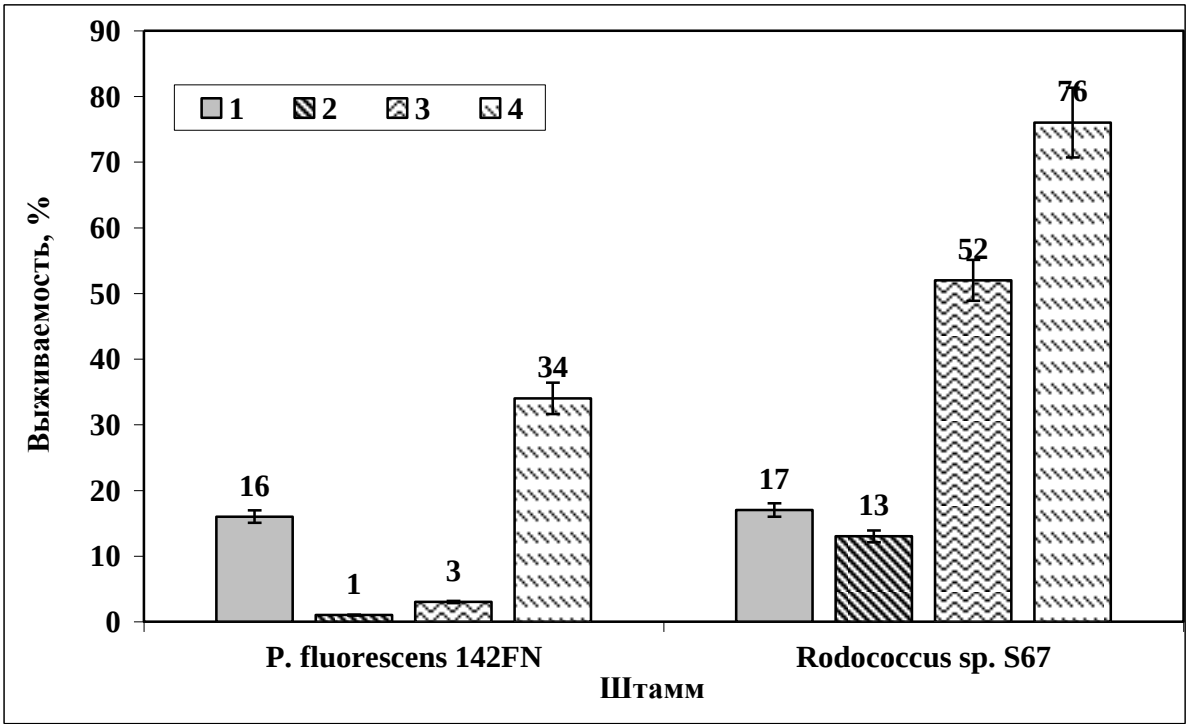


Рис. 71 Сравнение выживаемости микроорганизмов после лиофилизации и после контактной сушки: 1 – лиофилизация с сахарозой; 2 – лиофилизация с сахарозой и мочевиной; 3 – лиофилизация с сахарозой, мочевиной и полиглюкином 4 – контактная сушка.

Что касается действия защитных сред на сохранение жизнеспособности микроорганизмов при хранении, то можно отметить, что через полгода максимальная численность псевдомонад наблюдалась в варианте с сахарозой (1,2×107 КОЕ/мг), а родококков – в варианте «сахароза+тиомочевина+полиглюкин» (1,7×109 КОЕ/мг).

Табл. 43. Динамика численности микроорганизмов P. fluorescens 142NF при хранении в лиофилизированном виде с различными защитными средами, КОЕ/мг.

Время хранения, месяцы	Используемая защитная среда		
	20% сахароза	10% сахароза, 6% тиомочевина	8% сахароза, 4% тиомочевина, 4% полиглюкин
0	$(6,8\pm0,4)\times10^{9}$	$(1,3\pm0,2)\times10^{9}$	$(2,8\pm0,2)\times10^{9}$
1	$(22,8\pm4,1)\times10^{8}$	$(4,7\pm0,2)\times10^{8}$	$(7,7\pm0,8)\times10^{8}$
2	$(21,5\pm2,1)\times10^{7}$	$(1,1\pm0,2)\times10^{7}$	$(3,0\pm0,2)\times10^{7}$
6	$(12,2\pm2,1)\times10^{6}$	$(0,9\pm0,2)\times10^{6}$	$(1,1\pm0,2)\times10^{6}$

Табл. 44. Динамика численности микроорганизмов Rhodococcus sp. S67 при хранении в лиофилизированном виде с различными защитными средами, КОЕ/мг.

Время хранения, месяцы	Используемая защитная среда		
	20% сахароза	10% сахароза, 6% тиомочевина	8% сахароза, 4% тиомочевина, 4% полиглюкин
0	$(2,4\pm0,4)\times10^{11}$	$(1,7\pm0,2)\times10^{11}$	$(6,8\pm0,2)\times10^{11}$
1	$(1,8\pm4,1)\times10^{10}$	$(2,9\pm0,2)\times10^{10}$	$(3,8\pm0,8)\times10^{10}$
2	$(10\pm2)\times10^{9}$	$(4\pm1)\times10^{9}$	$(16\pm3)\times10^{9}$
6	$(4,1\pm0,1)\times10^{8}$	$(6,1\pm0,2)\times10^{8}$	$(17\pm1)\times10^{8}$

3.9.3 Новый способ получения сухой формы биопрепарата методом контактной сушки

В качестве другого - нового способа длительного хранения микроорганизмов-нефтедеструкторов применяли контактную сушку на носителе (вспученный перлитовый песок). Для этого смешанную с защитной средой и носителем биомассу сушили до постоянной массы при 37ºС. Из представленных на рис. 71 данных видно, что такой способ подготовки биомассы к хранению более удобен, чем сублимационное высушивание, так как выживаемость микроорганизмов при контактной сушке выше, чем при лиофильной: в 2 раза для псевдомонад и в 1,5 раза для родококков (Приложение 1).

Хранение образцов, подвергнутых контактной сушке, осуществляли при комнатной температуре (19-22ºС), при низкой положительной (2-4º) и при отрицательной(-20ºС). Как показывает сравнение данных по динамике численности микроорганизмов (табл. 35-36), однозначной зависимости между скоростью гибели клеток и типом высушивания не наблюдается. Для псевдомонад выживаемость после контактной сушки через месяц в 2,5 раза ниже, чем после лиофильной (для варианта с сахарозой): 13% и 35%, соответственно. Однако ещё через месяц, наоборот, в 2 раза выше: 6% и 3%. Для родококков наблюдается другая динамика: через месяц хранения процент жизнеспособных клеток после контактной и лиофильной сушек (для варианта «сахароза+тиомочевина») примерно одинаковы: 15% и 17%, соответственно. Но к концу второго месяца выживаемость для контактной сушки уже на порядок ниже: 0,2% против 2%. Тем не менее, за полгода выживаемость клеток и псевдомонад, и родококков упала более чем в 100 раз, составив 0,2% и 0,1%, соответственно, и стала сравнима для выживаемости лиофилизированных микроорганизмов.

При хранении образцов, обработанных контактной сушкой, в условиях низких температур число жизнеспособных клеток оказалась выше, чем при комнатной. Выживаемость микроорганизмов, содержащихся при –20ºС, была максимальной. Если через месяц хранения жизнеспособными были 32% клеток для штамма *P. fluorescens* 142NF и 22% для штамма *Rhodococcus* sp. S67, то через шесть – 24% и 20%, соответственно. В то же время при хранении в условиях пониженной температуры (2-4ºС) за полгода погибло 97% бактерий, а при комнатной – более 99,8% для обоих штаммов.

Для проверки углеводородокисляющей активности микроорганизмов из каждой точки во всех изученных вариантах хранения делали высев на минимальные среды, содержащие нефть, ДТ, нафталин, салицилат или гексадекан в качестве единственного источника углерода и энергии. Рост наблюдался во всех случаях, что говорит о сохранении деградативной активности.

Количественную оценку эффективности препаратов после хранения проводили в лабораторном модельном эксперименте. Изучали по два образца для каждого из двух штаммов: *P. fluorescens* 142NF и *Rhodococcus* sp. S67. Первый образец представлял собой свежую нативную биомассу микроорганизмов, полученную периодическим культивированием на богатой среде ЛБ. Второй – сухой препарат, высушенный контактной сушкой и хранящийся при –20°С в течение двух недель. Данными образцами инокулировали колбы с нефтью и через 14 дней сравнивали остаточное содержание общих углеводородов с абиотическим контролем. Как видно

из рис. 72, свежая культура родококков оказалась способна деградировать 21% нефти, в то время как сухой биопрепарат – 19%, снижение нефтеокислительной активности составило всего 2%. Деградативная способность псевдомонад в сухом биопрепарате сохранена на достаточно высоком уровне, несмотря на более значительное её падение по сравнению с нативной биомассой – на 9% (с 22% до 14%).

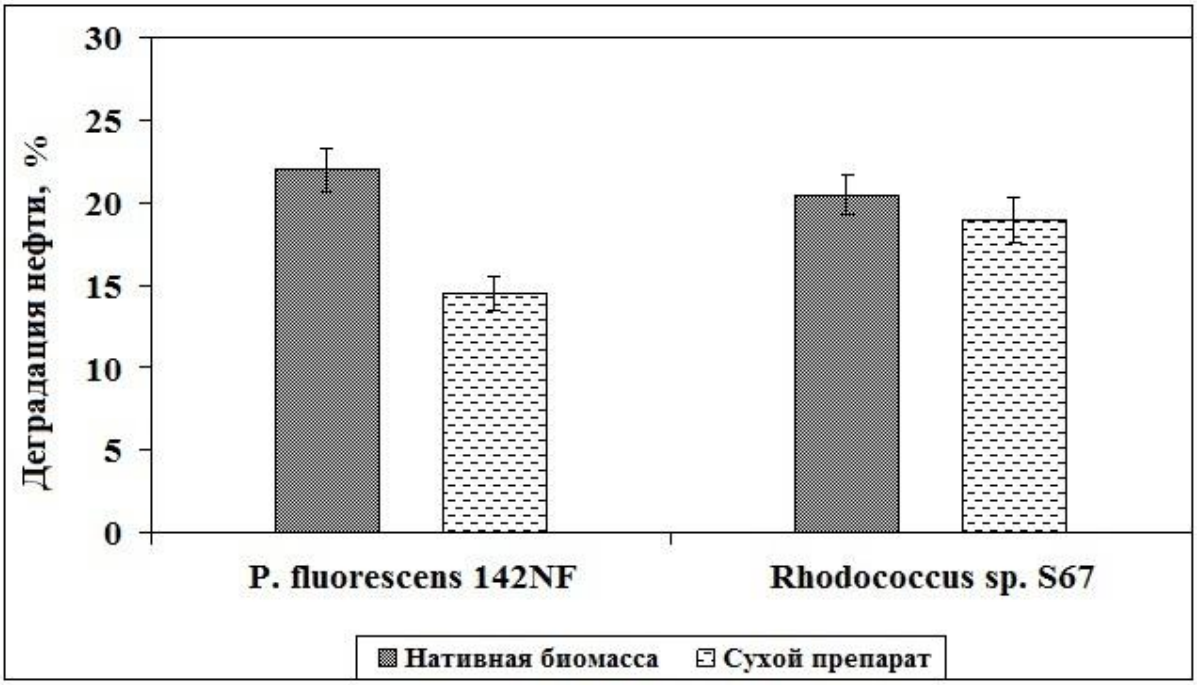


Рис. 72 Сравнение эффективности деградации нефти микроорганизмами, оживлёнными из лиофилизированных препаратов, хранившихся в течение двух недель при температуре -20℃ и свежей жидкой культурой тех же микроорганизмов.

Таким образом, для хранения микроорганизмов-нефтедеструкторов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* в течение шести месяцев предпочтительней использовать контактную сушку. Наибольшая выживаемость клеток достигается при хранении препаратов в условиях низких температур (–20°С). При этом микроорганизмы сохраняют свою деградативную активность в отношении углеводородов нефти.

3.10 Мониторинг интродуцированных в лабораторные модельные системы и открытую окружающую среду штаммов-нефтедеструкторов

Для слежения за судьбой штаммов, входящих в биопрепарат «МикроБак» как в лабораторных экспериментах, так и в открытой окружающей среде был выполнен анализ их культурально-морфологических признаков, метаболических и фенотипических характеристик (Табл. 1 – 3), а также проведено генотипирование штаммов родококков.

Штаммы *Pseudomonas putida* BS3701 и *Pseudomonas fluorescens* 142NF различали по культурально-морфологическим признакам (размер и форма колоний), а также по устойчивости к различным антибиотикам: для 142NF – ампициллин 500 мкг/мл среды, для BS3701 – рифампицин 100 мкг/мл среды. Дополнительным маркером для штамма BS3701 было ярко-зелёное свечение колоний в ультрафиолетовом свете (λ=254 нм) при росте на агаризованной среде Кинга Б. Кроме того, штамм BS3701 содержит конъюгативную плазмиду биодеградации нафталина и фенантрена pBS1141 размером 100 т.п.н. и криптическую плазмиду pBS1142 размером 50 т.п.н.

Для определения штаммов родококков, входящих в состав микробных ассоциаций «МикроБак» и «ВиО», было проведено генотипирование, поскольку эти штаммы были очень схожи между собой по культурально-морфологическим признакам. С этой целью применяли RAPD анализ с использованием 4 праймеров: OA20 (GTTGCGATCC), OG06 (GTGCCTAACC), OS09 (TCCTGGTCCC) и OS14 (AAAGGGGTCC). Наибольшие различия между штаммами были выявлены при использовании праймера OA20 (Рис. 73), который в дальнейшем был использован для мониторинга штаммов родококков в смешанных микробных популяциях и после их интродукции в окружающую среду. Дополнительными маркерами для штаммов родококков была их антибиотикорезистентность: *Rhodococcus erythropolis* S26 устойчив к стрептомицину, *Rhodococcus* sp. S67 – к канамицину, а *Rhodococcus* sp. X5 – к цефазолину, клафорану и гентамицину.

С использованием RAPD анализа с праймером OA20 (Рис. 73) было показано, что при селекции микроорганизмов-нефтедеструкторов в жидкой среде с целью получения микробной ассоциации, как основы биопрепарата «МикроБак», после 10 суток культивирования на нефти 80% общей популяции родококков было представлено штаммами *Rhodococcus* sp. S67 и *Rhodococcus* sp. X5 при 24°C, а при 4°C эти же два штамма составляли 70% общей популяции родококков (п. 3.5.1.2).

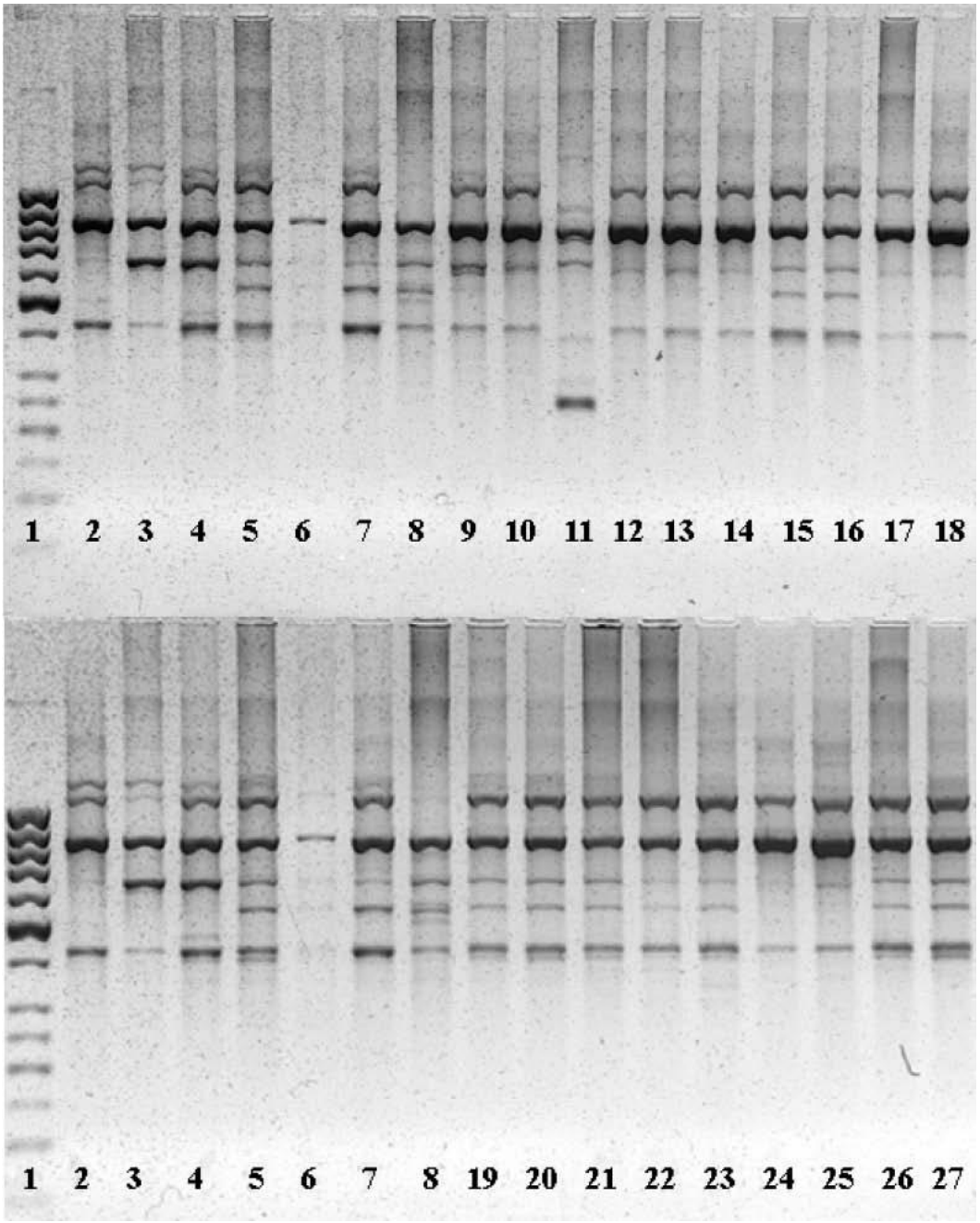


Рис.73 RAPD анализ штаммов родококков с праймером OA20. 1- 50 pb Ladder (Fermentas); 2- Rhodococcus sp. S25; 3- Rhodococcus sp. S26; 4- Rhodococcus sp. S67; 5- Rhodococcus sp. X5; 6 - Rhodococcus sp. X25; 7- Microbacterium sp. Ars25; 8- Rhodococcus equi Ars38; 9-27- клоны, составляющие большую часть популяции после культивирования в жидкой минеральной среде.

Вышеперечисленные признаки и характеристики штаммов были использованы для мониторинга интродуцированных микроорганизмов-деструкторов нефти опытного образца биопрепарата «МикроБак» в условиях полевого эксперимента и

изучения их выживаемости и конкурентоспособности (данные раздела 3.11).

3.11 Применение опытного образца биопрепарата «МикроБак» для биоремедиации почвы, загрязненной нефтью, в условиях полевого эксперимента

Эксперимент в открытой окружающей среде проводили на территории очистных сооружений г. Пущино с сентября 2006 г. по сентябрь 2007 г.

Изучение процесса биодеградации нефти, популяционной динамики штаммов-деструкторов в почве проводили на полевых участках по следующей схеме (Рис. 74). Для оценки вклада аборигенных микроорганизмов в деградацию нефти и влияния нефти на их численность использовали участок 2. Исследование популяционной динамики аборигенных микроорганизмов проводили во всех участках, а интродуцированных штаммов – в участках 3 и 4. Влияние вносимых биогенных элементов (источники азота, фосфора и калия) и интродукции ассоциации микроорганизмов-деструкторов на убыль нефти и численность бактерий изучали в участках 3 и 4. Участок 1 был контролем без внесения нефти.

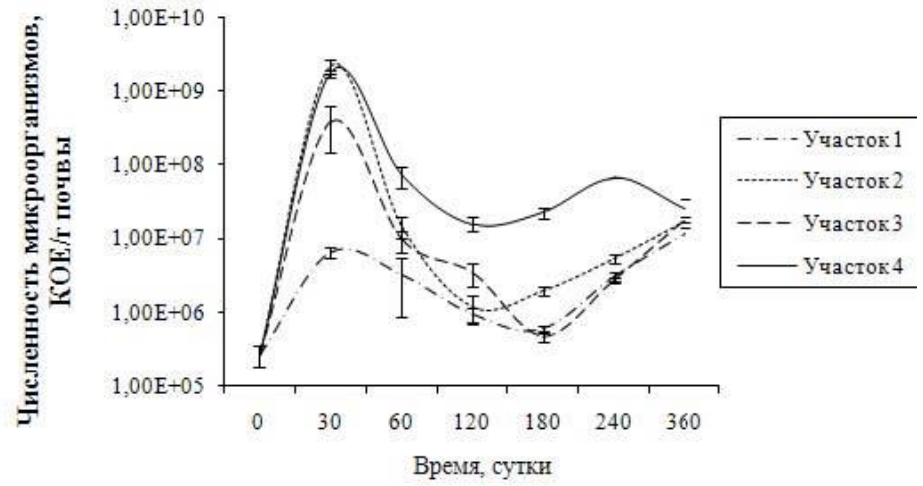
Участок 1 **Контроль**	**Участок 3** **Микробная ассоциация** **Минеральное удобрение**
Участок 2 **Контроль с нефтью**	**Участок 4** **Нефть** **Микробная ассоциация** **Минеральное удобрение**

Рис. 74 Схема полевого эксперимента.

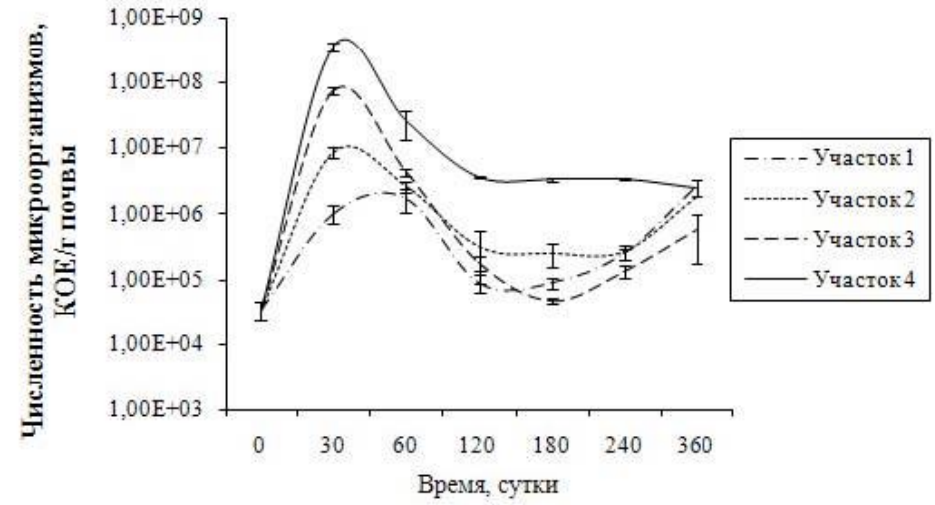
3.11.1. Изменение численности микробных популяций в почве

Мониторинг за численностью гетеротрофов, аборигенных нефтедеструкторов и интродуцированных штаммов проводили еженедельно на протяжении двух месяцев и далее каждые два месяца на протяжении 1 года. В течение первого месяца эксперимента общая численность и численность микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти постоянно увеличивалась. В этот период времени максимальная численность гетеротрофов была для участков 2 и 4 и составляла $2{,}2\times10^{9}$ и $1{,}8\times10^{9}$ КОЕ/г почвы, соответственно (Рис. 75А). Наибольшая численность

нефтедеструкторов была в участках 3 и 4 – $7{,}4\times10^{7}$ и $3{,}6\times10^{8}$ КОЕ/г почвы, соответственно, т.е. в участках с интродукцией микробной ассоциацией (Рис. 75Б). Исходная численность деструкторов углеводородов была $2{,}2\times10^{5}$ КОЕ/г почвы. Значительное увеличение их популяции наблюдали после 3 месяцев загрязнения. Численность и гетеротрофов, и нефтедеструкторов с октября постепенно снижалась, а, начиная с марта, повышалась во всех экспериментальных участках. Причём, в участках 1, 2 и 3 общая численность микроорганизмов после двух месяцев эксперимента была на порядок ниже, чем в участке 4, а численность штаммов-деструкторов углеводородов нефти – на один порядок через месяц и на полтора-два порядка через два месяца и далее. Как видно из данных рисунка 75 после зимнего времени года численность микроорганизмов возросла во всех участках и составила для гетеротрофов от $2{,}8\times10^{6}$ до $6{,}8\times10^{7}$ КОЕ/г почвы и для нефтедеструкторов – от $1{,}3\times10^{5}$ до $3{,}3\times10^{6}$ КОЕ/г почвы. Наименьшая общая численность бактерий в почве ($6{,}7\times10^{6}$ КОЕ/г почвы) наблюдалась в участке 1, который был контролем без внесения нефти.



А



Б

Рис. 75 Общая численность микроорганизмов (А) и численность нефтедеструкторов (Б).

3.11.2. Мониторинг интродуцированной микробной ассоциации

Микробная ассоциация вносилась в почву в виде концентрированной суспензии, содержащей 1×10^{9} КОЕ/мл жизнеспособных клеток на один участок. Таким образом, исходная численность интродуцированной ассоциации была 1×10^{7} КОЕ/г почвы. На протяжении всего эксперимента общая численность внесённых микроорганизмов не опускалась ниже, чем $2{,}6\times10^{6}$ КОЕ/г почвы в участке 4 и

1×10^4 КОЕ/г почвы – в участке 3. Такая разница (на два порядка) численности в участках 3 и 4 объясняется отсутствием в участке 3 основного ростового субстрата – нефти. Из данных таблицы 45 видно, что численность интродуцированных микроорганизмов в участке 4 поддерживалась на уровне 3×10^6 КОЕ/г почвы в течение первых двух месяцев эксперимента, затем происходило незначительное уменьшение (на один порядок) их численности. В участке 3 (без основного источника углерода и энергии) наблюдалось постепенное снижение популяции интродуцированных штаммов-деструкторов. Однако, аналогичная картина была и для общей численности нефтедеструкторов в этот промежуток времени (октябрь 2006 – март 2007 гг.), но доля интродуцированной ассоциации от общей численности нефтедеструкторов была на достаточно высоком уровне, и что самое главное, была максимальной для этого участка после 120 дней (т.е. в январе 2007 г.) – 29,4%, т.е. именно интродукция психротрофных микроорганизмов привела к таким результатам. Особого внимания заслуживает тот факт, что численность интродуцированной ассоциации составляла от 1 до 79% на протяжении 6 месяцев эксперимента, что свидетельствует о выживаемости внесённых микроорганизмов в почве в открытой окружающей среде. Ранее это было продемонстрировано нами только в лабораторных микрокосмах (п. 3.1.1.4).

Кроме того, из рис. 76 следует, что температура почвы в первые 60 суток эксперимента изменялась в диапазоне от +21°С до -1°С, но несмотря на это численность интродуцированной микробной ассоциации оставалась на достаточно высоком уровне. Таким образом, тот факт, что наши микроорганизмы являются психротрофными (с диапазоном роста 2-32ºС), привел к тому, что они выжили в почве даже в зимний период времени.

Табл. 45. Динамика численности интродуцированной микробной ассоциации.

Номер участка	Интродуцированная ассоциация	% от общей численности нефтедеструкторов
В начале эксперимента		
3 (почва без нефти)	$5{,}2\times10^5$	11,06
4 (почва с нефтью)	$6{,}0\times10^5$	0,98
Через 30 дней (октябрь 2006 г.)		
3	$1{,}0\times10^6$	1,35
4	$3{,}0\times10^6$	0,83
Через 60 дней (ноябрь 2006 г.)		
3	$8{,}3\times10^5$	19,8
4	$3{,}1\times10^6$	12,4
Через 120 дней (январь 2007 г.)		
3	$5{,}3\times10^4$	29,4
4	$3{,}5\times10^5$	18,6
Через 180 дней (март 2007 г.)		
3	$1{,}0\times10^4$	21,9
4	$2{,}6\times10^6$	78,8

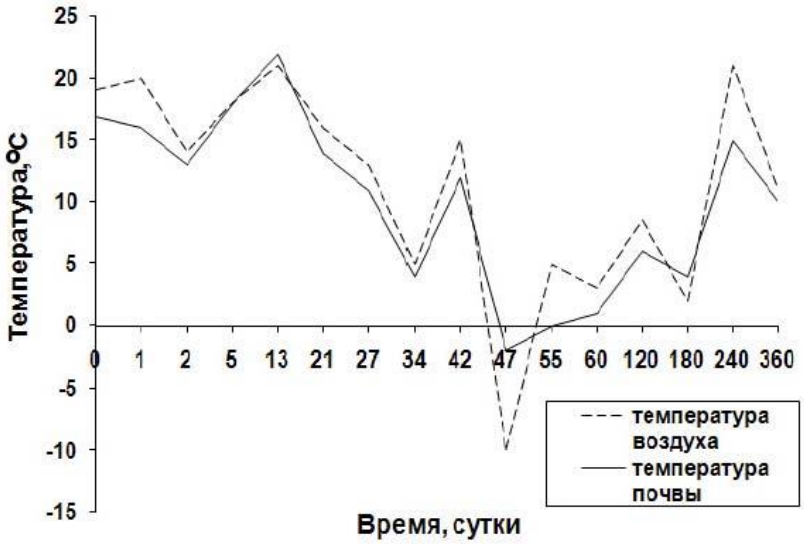


Рис. 76 Динамика изменения температуры воздуха и почвы.

3.11.3. Убыль нефти в полевом эксперименте

Степень деградации нефти определяли в участках 2 (контроль) и 4 (интродуцированная ассоциация + удобрение). Исходный уровень загрязнения нефтью

составлял 2,5%. Только через две недели после внесения в почву загрязнителя (нефти) произошло его равномерное распределение в почвенном слое на глубине 10-15 см. В участке 2 деградация не происходила в течение первого месяца эксперимента. Напротив, в участке 4 снижение концентрации нефти началось сразу и уже после первых двух недель составляла 6,6% (Рис. 77). На протяжении всех месяцев исследований степень деградации нефти в участке с интродукцией микроорганизмов и внесением удобрения была выше, чем в контрольном участке. При обработке загрязнённых участков микробной ассоциацией совместно с удобрением наблюдалось значительное снижение содержания остаточной нефти, что связано в первую очередь с увеличением числа углеводородокисляющих микроорганизмов на 4 порядка (Рис. 77). Большая часть нефти удалилась после первых двух месяцев эксперимента, где степень деградации составила 33,9% и 21,6% - в контроле. Добавка азота и фосфора в виде комплексного удобрения, увлажнение за счёт природных осадков и дополнительного полива, достаточная аэрация стимулировали активный процесс биодеградации нефти. В то же время следует отметить, что эти же условия активировали и нефтеокисляющую микрофлору почвы, что способствовало интенсификации процессов самоочищения нефтезагрязнённой почвы.

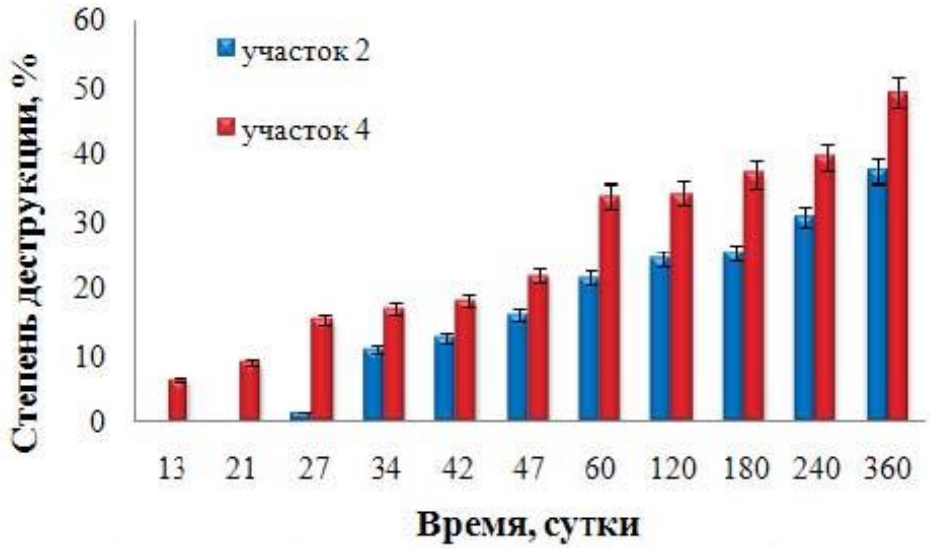


Рис. 77 Убыль нефти в полевом эксперименте.

Из данных рисунка 77 следует, что в дальнейшем также происходила убыль нефти во всех участках и после 1 года была 49,1% и 37,5% для участков 4 и 2, соответственно. Снижение температуры воздуха и почвы (Рис. 76) в ноябре-январе не привело к прекращению процесса деградации нефти, что, возможно, связано с

интродукцией ассоциации психротрофных микроорганизмов-деструкторов.

Для установления степени восстановления качеств почвы после загрязнений сырой нефтью в полевом эксперимента использовали овёс в качестве биоиндикатора. Полученные через месяц после высева результаты продемонстрировали снижение токсичности почвы после интродукции ассоциации штаммов-деструкторов (Рис. 78).

А **Б**

Рис. 78 Фотосъёмка результатов полевого эксперимента. Июнь 2007 года. А – контроль (почва с нефтью), Б – загрязнённый нефтью участок с интродукцией микробной ассоциации и внесением минерального удобрения.

Таким образом, степень деградации нефти в участке с интродукцией штаммов-деструкторов и внесением минерального удобрения достигла почти максимального значения через 60 дней (33,9%). В течение последующих 120 дней процент убыли изменился незначительно (37,0%). А через 1 год убыль нефти составила 49,1 %.

3.12 Полевые испытания опытного образца биопрепарата «МикроБак» по очистке грунта от загрязнений нефтью и нефтепродуктами на территории ОАО «Тульская Топливно-Энергетическая Компания»

Полевые испытания опытного образца биопрепарата «МикроБак» по очистке грунта, загрязнённого нефтепродуктами, проводились на территории ОАО «Тульская Топливно-Энергетическая Компания» (Тульская область, Киреевский район, д. Рождественка) в осенний период с сентября по ноябрь 2007 года. Загрязнение грунта происходило во время аварийных разливов нефтепродуктов (газовый конденсат, дизельное топливо, бензин, мазут) при их разгрузке и прорывов трубопроводов.

Загрязнённые участки посыпали песком, который затем складировали в специально отведённом месте, где и проводили процесс очистки грунта от смешанного загрязнения вышеперечисленными нефтепродуктами. Исходный уровень загрязнения грунта составлял 14213 мг/кг грунта (1,4 весовых %). Очистку производили путём интродукции микробной ассоциации (опытного образца биопрепарата «МикроБак»), состоящей из природных микроорганизмов-нефтедеструкторов *Rhodococcus* sp. X5, *Rhodococcus* sp. S67, *Pseudomonas* sp. 142NF(pNF142) и *Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142).

Наращивание биомассы штаммов, входящих в состав биопрепарата, проводили по отдельности в ферментёрах АНКУМ. Для сохранения биомассы в активном состоянии к полученной концентрированной суспензии (КС) каждого штамма добавляли защитную среду, состоящую из растворов сахарозы, тиомочевины и полиглюкина. Доставку к месту загрязнения приготовленной опытной партии биопрепарата осуществляли в виде КС. Смешивание биомассы четырёх штаммов осуществляли на месте в равных объёмных соотношениях. Для приготовления рабочего раствора 300 мл КС (с численностью $2{,}5 \times 10^{10}$ КОЕ/мл) биопрепарата вносили при перемешивании в ёмкость, содержащую 5 л пресной воды. Перемешивание осуществляли до полного исчезновения осадка.

Одновременно с интродукцией биопрепарата вносили минеральное удобрение (нитроаммофоска). Через 14 суток осуществляли повторное внесение биопрепарата и удобрения, которое сопровождалось рыхлением грунта на глубину 10-20 см.

Эффективность биоремедиации загрязнённого нефтепродуктами грунта оценивали по уменьшению общего содержания нефтяных углеводородов. Результаты проведённых полевых испытаний по очистке грунта, загрязнённого комплексным загрязнителем (дизельное топливо, газовый конденсат, мазут), представлены в таблицах 46-47. В течение одного месяца содержание остаточных углеводородов нефтепродуктов снизилось на 99,6% за счёт одновременного внесения биопрепарата и минерального удобрения, по сравнению с контрольным участком - 90,7%.

Кроме того, на протяжении двух месяцев полевых испытаний проводили мониторинг численности гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов. Из данных рисунка 79 следует, что первоначальное перемешивание грунта на глубине 10-20 см привело к значительному увеличению численности микроорганизмов - на два порядка.

Табл. 46. Характеристики почвы и воздуха во время полевых испытаний.

Дата взятия пробы	Температура воздуха, ℃	Температура грунта, ℃	pH водной вытяжки грунта	Влажность грунта, %
14 сентября 2007 г.	9	11	7,35	24
28 сентября 2007 г.	22	16	7,11	20
17 октября 2007 г.	15	8	7,41	28
15 ноября 2007 г.	0	0	7,32	30

Табл. 47. Убыль углеводородов нефтепродуктов.

Дата взятия пробы	Остаточное содержание нефтепродуктов, мг/кг грунта		Степень очистки, %	
	Контрольный участок	Опытный участок	Контрольный участок	Опытный участок
14 сентября 2007 г.	13026 ± 4559	11994 ± 4198	-	-
17 октября 2007 г.	1214 ± 425	52,0 ± 23,4	90,7	99,6
15 ноября 2007 г.	19,6 ± 8,8	18,0 ± 8,1	99,8	99,8

Затем происходило незначительное изменение численности микробных популяций, однако численность бактерий в опытном участке была всегда больше, чем в контрольном.

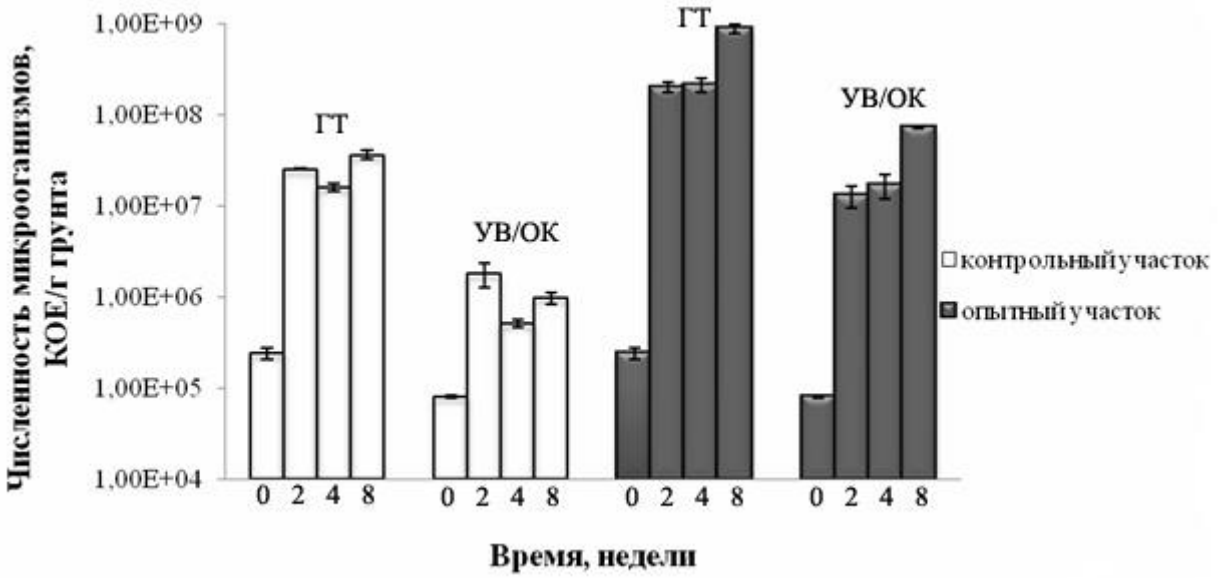


Рис. 79 Динамика численности микробных популяций (ГТ – гетеротрофные микроорганизмы, УВ/ОК – углеводородоокисляющие микроорганизмы).

Таким образом, при проведении полевых испытаний показана возможность

осуществления биоремедиации *in situ* с помощью данного биопрепарата и её эффективность даже при низкой температуре окружающей среды (при температуре грунта 0-16ºС). Акт полевых испытаний прилагается (Приложение 2).

3.13 Разработка растительно-микробных ассоциаций для биоремедиации нефтезагрязненных почв и оценка их эффективности при деградации нефти в стерильных модельных почвенных системах

Применение биопрепаратов имеет целью обеспечить снижение содержания углеводородов нефти в окружающей среде до нормативного уровня ДОСНП (допустимого остаточного содержания нефтепродуктов), который зависит от назначения земель (сельскохозяйственные или лесохозяйственные), типа почв и нормативных документов конкретного региона. Для восстановления плодородия и практической ценности нарушенных земель, растительного покрова, естественного экологического статуса ранее загрязненных и выведенных из хозяйственного использования территорий особенно перспективно и актуально применение фиторемедиационных технологий с использованием растительно-микробных ассоциаций. Для разработки таких ассоциаций необходимо учитывать устойчивость растений к нефтяному загрязнению, взаимовлияние микроорганизмов и растений, их деградативный потенциал в отношении углеводородов нефти.

3.13.1 Скрининг растений для составления эффективной растительно-микробной ассоциации

На первом этапе работы был проведен скрининг различных растений на предмет выявления наиболее устойчивых к нефтезагрязнению. Наиболее устойчивыми оказались некоторые виды бобовых, подсолнечник, кукуруза, ячмень и газонная трава (смесь, основу которой составляет овсяница красная) (Табл. 48). При выборе наиболее эффективного растения для составления микробно-растительной ассоциации помимо устойчивости к токсичным углеводородам нефти учитывалась корневая система растений, то есть тип корней (стержневой, мочковатый), их разветвленность и охватываемый ими объем почвы. По результатам скрининга растений для фиторемедиации нефтезагрязненной почвы были выбраны ячмень и газонная трава.

Табл. 48. Растения, использованные для скрининга.

Название растения	Устойчивость к 2% нефти
Рапс *Brassica napus*	-
Горчица белая *Sinapis alba* L.	-
Кукуруза *Zea* L.	++
Рожь *Secale cereale*	-
Пшеница *Triticum*	-
Трава газонная (овсяница красная) *Festuca rubra L.*	++
Овес *Avena L.*	-
Смесь (редька масличная Тамбовчанка, горчица белая Рапсодия, рапс яровой Ратник) *Raphanus sativus var. Oleiformis, Sinapis alba, Brassica napus*	-
Фацелия пижмолистная *Phacelia tanacetifolia*	-
Донник желтый *Melilotus officinalis*	-
Ячмень яровой «Зазерский 85» *Hórdeum*	++
Петрушка «Карнавал» *Petroselínum*	-
Бобы овощные трижды белые *Fabaceae*	-
Фасоль «Московская белая зеленостручная 556» *Phaseolus vulgaris*	-
Мятлик луговой «Балин» *Poa pratensis*	-
Горох сахарный «Орегон» *Pisum sativum* L. convar. *axiphium* Alef emend. C.O.Lehm	+
Подсолнечник «Енисей» *Helianthus annuus L.*	+
Горох овощной «Аэлита ранний 301» *Pisum sativum*	-
Фасоль обыкновенная Phaseolus vulgaris	+

Для изучения степени деградации нефти, взаимодействия между микроорганизмами отселектированной ассоциации «ВиО» (*Rhodococcus erythropolis* S26, *Acinetobacter baumannii* 1б, *Acinetobacter baumannii* 7 и *Pseudomonas putida* F701), а также влияния микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти на рост растений (ячменя) был проведен стерильный почвенный эксперимент по схеме, представленной в таблице 49. Концентрация нефти в модельных системах составляла 2%.

Через 10 суток эксперимента оценивали:

- токсический эффект нефти на растения;
- убыль нефти за счет деградации каждым штаммом;
- убыль нефти в присутствии растений;
- степень деструкции нефти ассоциацией микроорганизмов;

- защитный эффект на растения каждого из штаммов микроорганизмов;
- защитный эффект на растения ассоциации микроорганизмов;
- численность микроорганизмов на корнях (в ризоплане) и в ризосфере.

Табл. 49. Схема стерильного модельного эксперимента.

№	Модельная система
1	Растения
2	Растения + нефть
3	Нефть
4	Растения + нефть + штамм 1б
5	Растения + нефть + штамм F701
6	Растения + нефть + штамм 7
7	Растения + нефть + штамм S26
8	Растения + нефть + 1б+7+S26+F701 (ассоциация «ВиО»)
9	Нефть + 1б+7+S26+F701 (ассоциация «ВиО»)

3.13.2 Влияние микроорганизмов, входящих в состав ассоциации «ВиО» на рост растений в условиях загрязнения почвы нефтью

Ранее было показано (Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями/ под ред. В. В. Игнатова, 2005), что добавление нефти в питательный раствор приблизительно в 10 раз ингибировало развитие проростков пшеницы по сравнению с контрольным вариантом, в то время, как в настоящей работе снижение роста в результате токсического эффекта в отношении проростков ячменя было в 4 раза.

Как видно из данных рисунка 80 штаммы F701, 7, S26, а также ассоциация «ВиО» оказывают значительный защитный эффект на растения, снижая токсический эффект загрязнителя, что отражается на длине побега, по сравнению с отрицательным контролем - система №2 (Табл.49). Возможно, это связано со способностью микроорганизмов колонизировать корни растений.

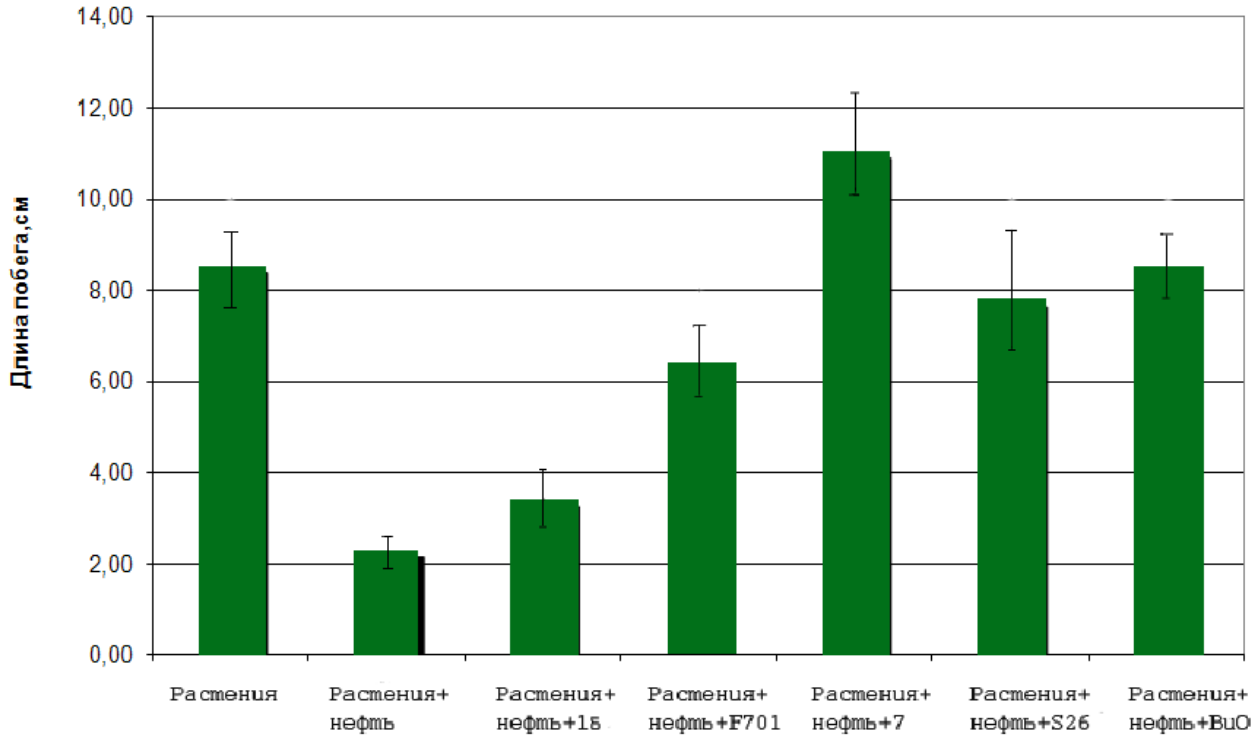


Рис.80 Длина побега растений (ячмень) в стерильном модельном эксперименте через 10 дней культивирования.

3.13.3 Динамика численности интродуцированных штаммов-деструкторов углеводородов нефти

Практически все штаммы в ризоплане имели концентрацию 10^8 КОЕ/г корня, как при раздельной интродукции в систему (Рис.81(А)), так и в составе ассоциации (Рис.81(Б)). Численность микроорганизмов на корнях растений (Рис.81) была на порядок выше, чем в ризосфере (Рис.82), как при раздельной, так и при совместной инокуляции штаммов-деструкторов.

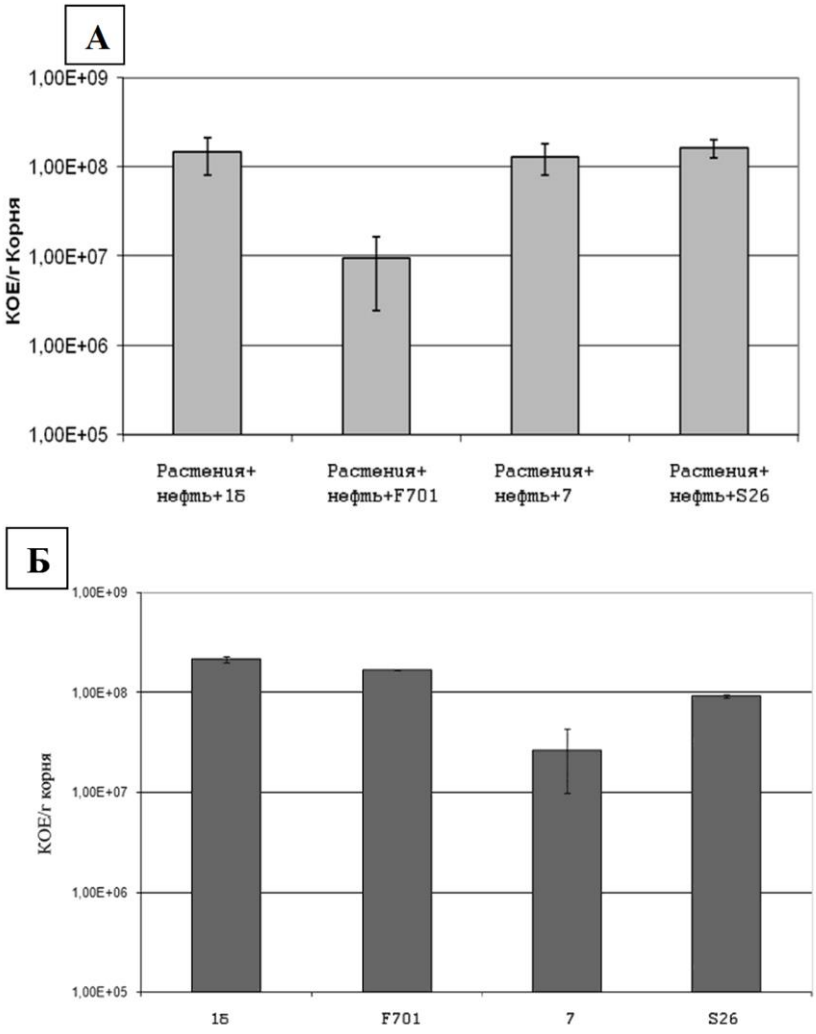


Рис. 81 Численность микроорганизмов на корнях растений
А - При раздельной интродукции каждого из штаммов
Б- При интродукции ассоциации «ВиО».

При совместной интродукции микроорганизмов-деструкторов, численность штамма F701 на корнях ячменя увеличилась на порядок, тогда как концентрация штамма 7 снизилась на пол порядка. Однако, в ризосфере в отношении этих штаммов такого явления не наблюдалось (Рис.82).

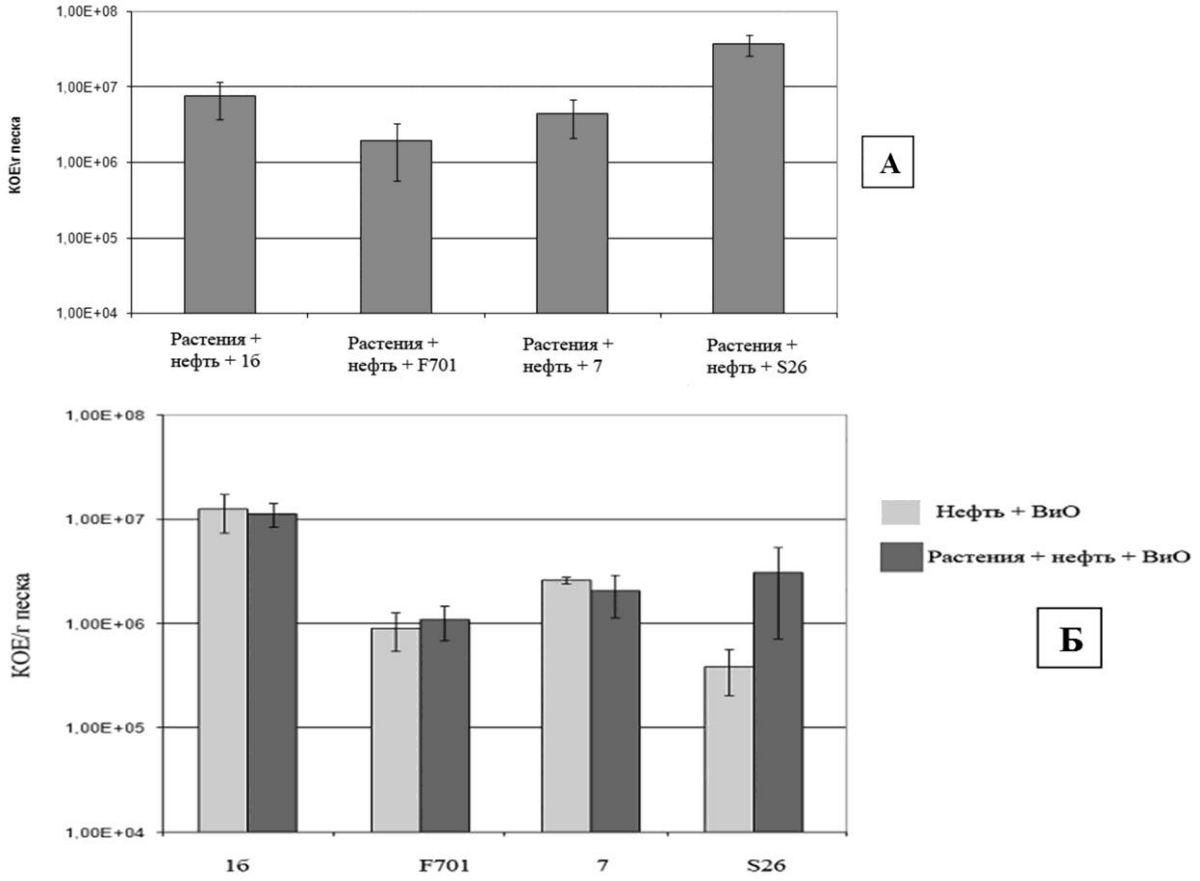


Рис.82 Численность микроорганизмов в ризосфере и в почве без растений
А – При раздельной интродукции каждого из штаммов
Б - При интродукции ассоциации «ВиО».

При сравнении рисунка 82(Б) с рисунком 82(А) видно, что при совместной инокуляции штаммов в почву их численность в составе ассоциации практически не изменялась по сравнению с раздельной интродукцией в модельные системы каждого из штаммов (кроме штамма S26). Как видно из данных рисунка 82(Б) внесение растений в систему слабо повлияло на численность микроорганизмов в почве, концентрация штаммов-деструкторов составляла 10^6-10^7 КОЕ/г песка. Тот факт, что концентрация каждого штамма бактерий в составе ассоциации как на корнях (Рис.81), так и в ризосфере (Рис. 82) растений различается незначительно (0.5-1 порядок), свидетельствует о том, что отселектированные микроорганизмы могут совместно сосуществовать без ущерба для численности каждого из них, т.е. внутри ассоциации отсутствуют взаимодействия, отрицательно влияющие на рост микроорганизмов. Это важно при использовании микробного консорциума для ремедиации нефтезагрязненных почв.

3.13.4 Деградация нефти микробно-растительными ассоциациями

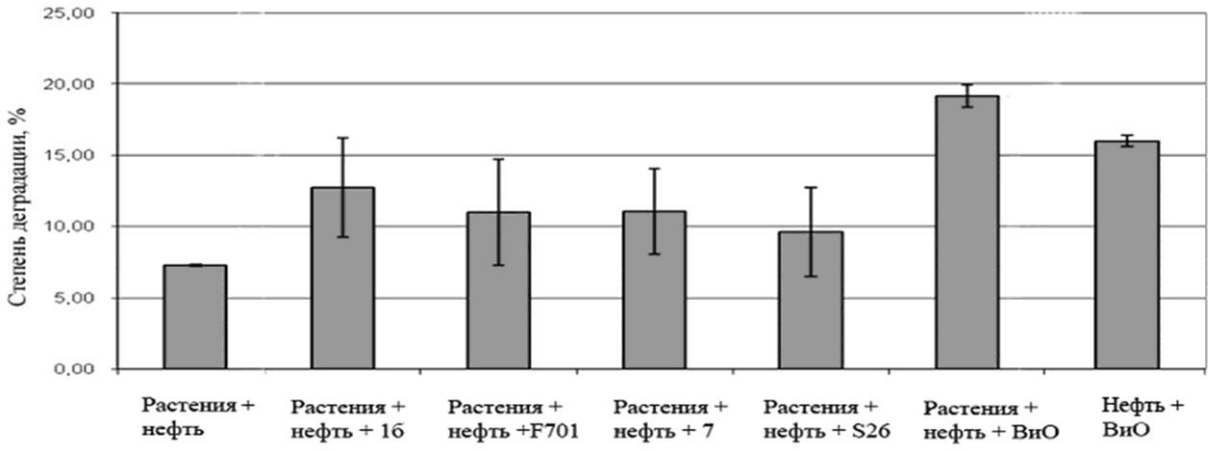


Рис. 83 Убыль нефти в модельных почвенных системах через 10 суток культивирования.

При инокуляции отдельных штаммов в системы с растениями наблюдалось снижение концентрации углеводородов нефти на 10%, а при использовании ассоциации «ВиО» показатель деструкции нефти составил 16%. Что возможно свидетельствует о процессе кооперации между микроорганизмами-деструкторами внутри ассоциации.

Как видно из данных рисунка 83 наиболее эффективным вариантом оказалась растительно –микробная ассоциация Ячмень - ассоциация «ВиО» (19%). Причем, как видно из диаграммы, растения вносят вклад (7%) в процесс ремедиации за счет своих собственных ферментных систем. Данный рисунок показывает наибольшую эффективность отселектированной растительно-микробной ассоциации по сравнению с использованием только растений, только ассоциации «ВиО» и растений, ассоциированных с отдельным штаммом-деструктором углеводородов нефти.

3.14 Оценка эффективности деградации нефти в нестерильных модельных почвенных системах, содержащих растительно-микорбные ассоциации

3.14.1 Влияние микробной ассоциации «ВиО» на рост ячменя в условиях загрязнения почвы нефтью

Был проведен открытый лабораторный эксперимент, в котором использовались почвенные модельные системы с 2% нефти и растениями (ячмень) (Табл. 50).

Табл. 50. Схема нестерильного лабораторного модельного эксперимента

№	Модельная система
1	Растения
2	Нефть + растения
3	Растения + ассоциация микроорганизмов «ВиО»
4	Нефть + растения + удобрения (нитроаммофоска) + ассоциация микроорганизмов «ВиО»
5	Нефть + растения + ассоциация микроорганизмов «ВиО»

С целью оценки влияния минеральных удобрений на процесс снижения концентрации углеводородов нефти в модельную систему №4 вносили «Нитроаммофоску». Так как в таких не идеальных условиях (по сравнению с условиями стерильного эксперимента), растения развивались достаточно медленно, то, ориентируясь на длину побегов растений, было принято решение продлить период проведения эксперимента до 14 суток.

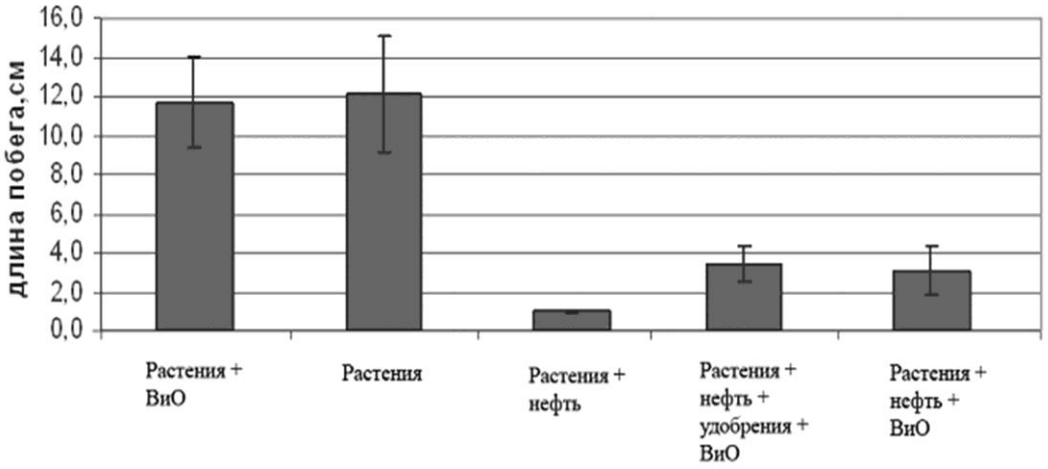


Рис. 84 Длина побега растений через 14 суток культивирования

Данные рисунка 84 демонстрируют, что при интродукции в систему микроорганизмов устойчивость растений к нефтезагрязнению повышалась в 3 раза в условиях загрязнения нефтью по сравнению с отрицательным контролем (растения+нефть). Отселектированная ассоциация штаммов-деструкторов «ВиО» являлась не токсичной для растений, так как не угнетала их рост по сравнению с положительным контролем.

3.14.2 Динамика численности микроорганизмов в составе растительно-микробных ассоциаций в ризосфере и ризоплане растений

Численность микроорганизмов в составе ассоциации существенно не менялась и оставалась на уровне 10^6 КОЕ/г почвы в ризосфере и 10^7-10^8 КОЕ/г корня в ризоплане растений.

Внесение в систему минерального удобрения не повлияло на увеличение концентрации интродуцированных организмов микроорганизмов (Рис.85). В ризосфере численность микроорганизмов была почти на 1-2 порядка ниже, чем на корнях ячменя, а внесение удобрений способствовало снижению концентрации родококков в ризосфере на порядок.

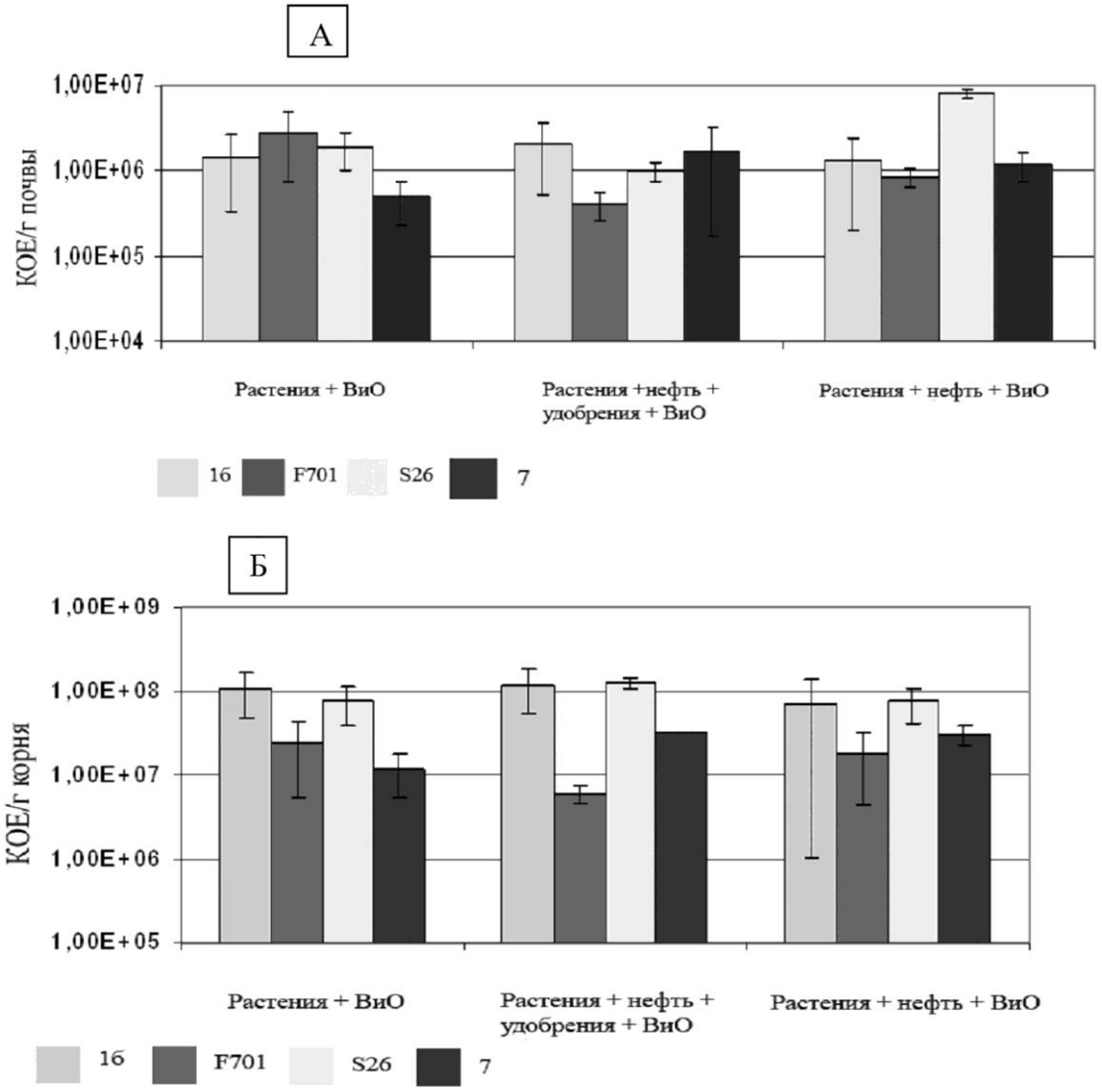


Рис. 85 Численность микроорганизмов в ризосфере (А) и на корнях (Б) в составе ассоциации «ВиО».

3.14.3 Убыль нефти при использовании растительно-микробной ассоциации в нестерильных модельных системах

Как известно минеральные вещества (удобрения), вносимые в почву повышают интенсивность и эффективность физиологических процессов микроорганизмов, в том числе и процесса биодеградации загрязнителей (Биккинина А.Г. с соавт. 2006). Как видно из полученных в ходе работы данных (Рис.86) это явление не обязательно сопровождается увеличением численности микроорганизмов в почве, как это было показано ранее (п.3.12). Таким образом, минеральные удобрения стимулируют активность микрофлоры почвы, но не обязательно влияют на концентрацию интродуцированных бактерий.

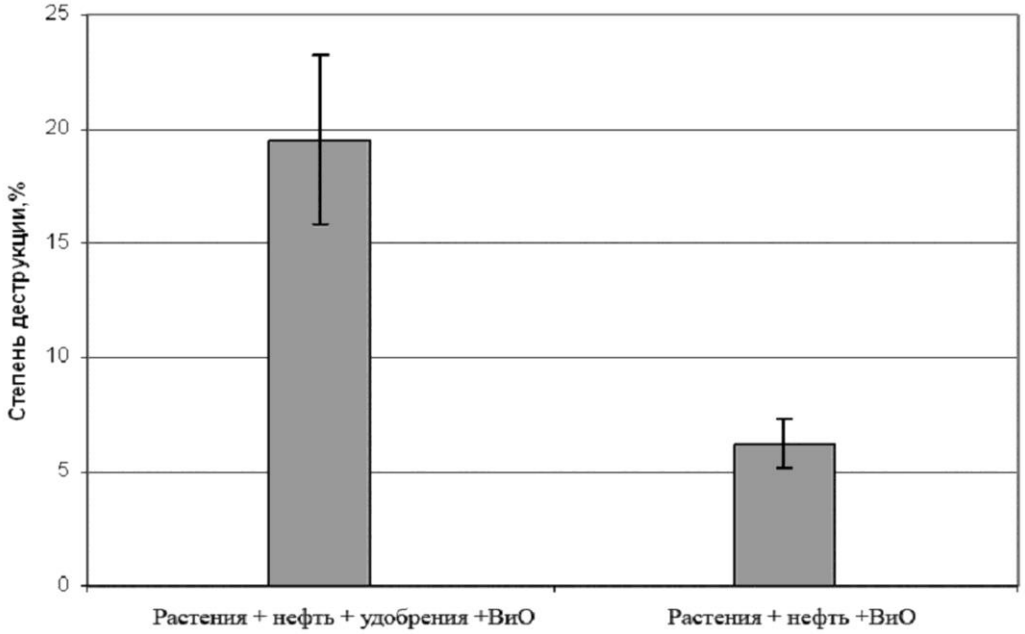


Рис.86 Убыль нефти в нестерильных модельных почвенных системах через 14 суток культивирования.

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

Полевые испытания были проведены на территории нефтяных месторождений Ямало-Ненецкого автономного округа. Температура воздуха в течение суток колебалась в широком диапазоне от -2- +24°С. При этом оценивали эффективность микроорганизмов-деструкторов в опытном образце биопрепарата «ВиО» в сравнении с двумя коммерческими биопрепаратами ЗАО «Биоойл»: «Биоойл-Югра» и «Биоойл-СН».

Территории участков с нефтяными загрязнениями обрабатывались биопрепаратами (численность вносимых микроорганизмов была порядка 10^5 КОЕ/г почвы), вносились удобрения (мочевина), с целью стимуляции аборигенной и интродуцированной почвенной микрофлоры. Повторная интродукция микроорганизмов проводилась через 2 недели. Для повышения эффективности деградации нефти был проведен посев растений (ячмень).

3.15.1 Влияние биопрепаратов «ВиО» «Биоойл-СН» и «Биоойл-Югра» на рост ячменя в условиях реального разлива нефти

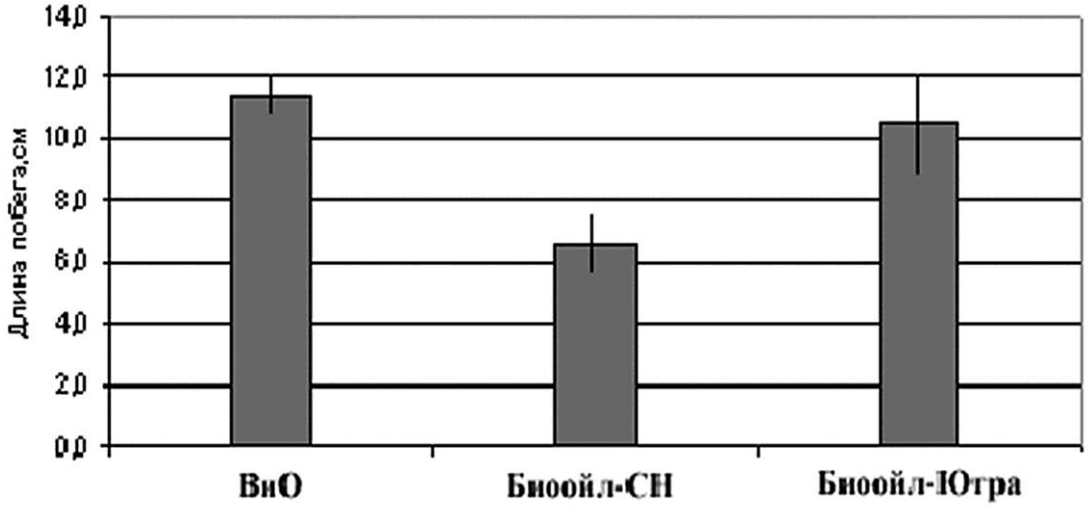


Рис.87 Длина побегов растений на участке, обработанном биопрепаратами через 2 месяца.

Как видно из рисунка 87 наилучший защитный эффект на побеги ячменя проявлялся при обработке загрязненного участка биопрепаратами «ВиО» и «Биоойл-Югра», при этом длина побегов растений через 2 месяца достигла 11 см.

3.15.2 Численность микроорганизмов-деструкторов в почве и на корнях ячменя в условиях реального разлива нефти

Через 2 месяца проведения полевых испытаний численность всех штаммов в составе биопрепарата «ВиО» на корнях растений составила 10^7КОЕ/г корня. Наибольшей численности достиг штамм 1б ($8 \cdot 10^7$ КОЕ/г корня), остальные микроорганизмы имели концентрацию $2{,}5 \cdot 10^7$ КОЕ/г корня (Рис.88).

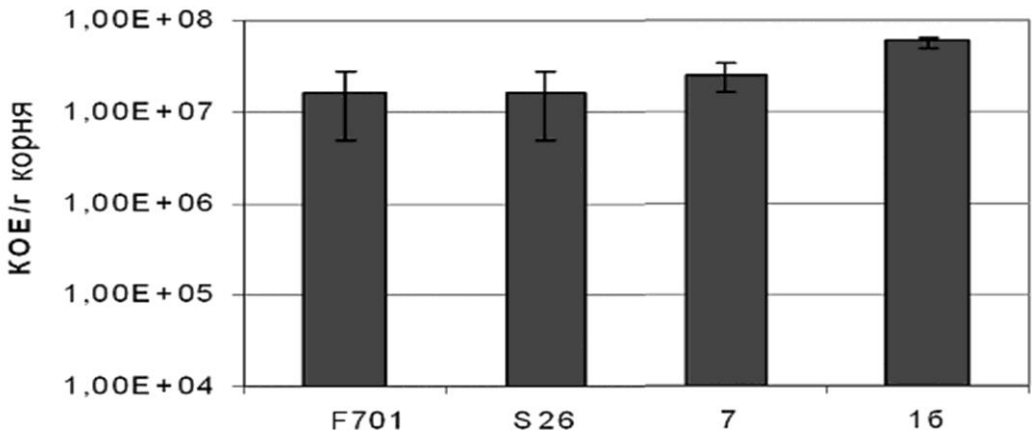


Рис.88 Численность штаммов на корнях растений в составе отселектированной микробной ассоциации, через 2 месяца после обработки участка, загрязненного нефтью.

В почве, на участке, обработанном «ВиО», численность штаммов была ниже, чем на корнях ячменя, и составила 10^3-10^4КОЕ/г почвы, причем наибольшую численность имели штаммы родов *Pseudomonas* и *Acinetobacter*, родококки оказались менее конкурентоспособны в данных условиях (Рис.89).

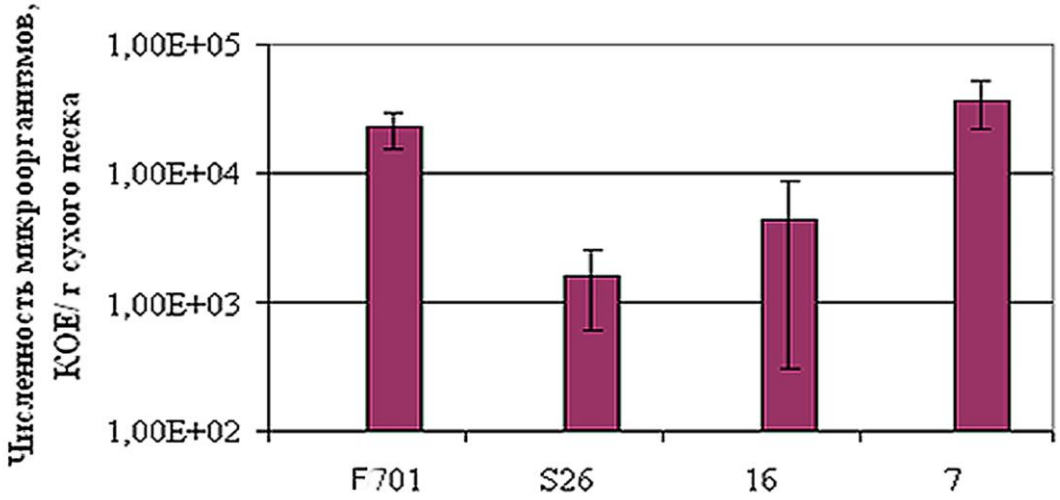


Рис. 89 Численность штаммов в составе отселлектированной микробной ассоциации в почве через 2 месяца после обработки участка, загрязненного нефтью.

Как показывает рисунок 90 через 2 месяца эксперимента наибольшая численность нефтедеструкторов наблюдалась на участке, обработанном «ВиО», причем, начальное содержание нефтедеструкторов было на уровне $1.5 \cdot 10^2$КОЕ/г песка при общей численности гетеротрофов $5 \cdot 10^4$ КОЕ/г песка.

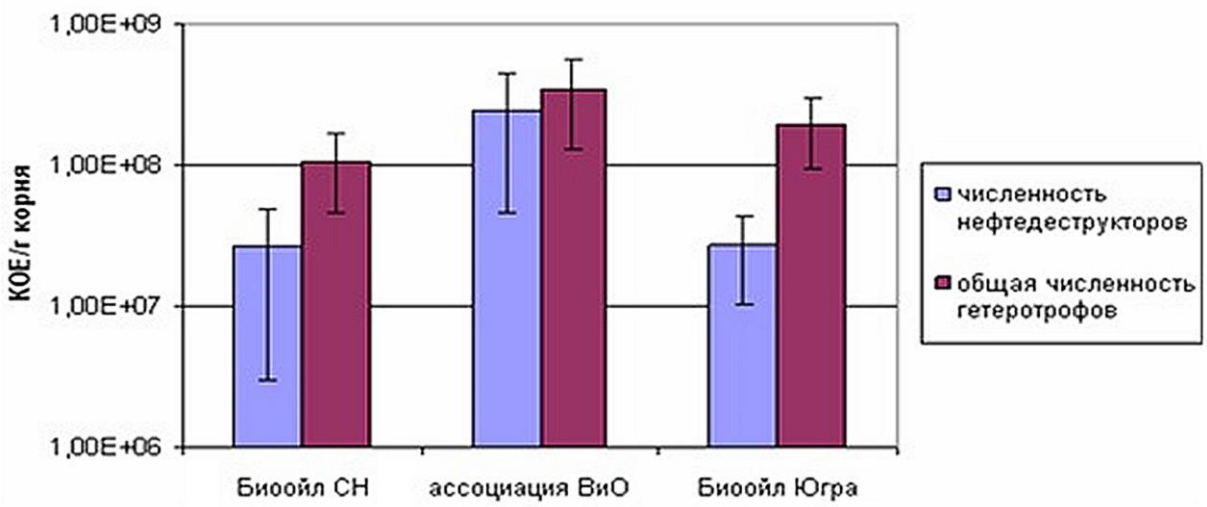


Рис. 90 Общая численность нефтедеструкторов и гетеротрофов в ризосфере растений через 2 месяца после обработки участка, загрязненного нефтью.

Через 2 месяца испытаний общая численность, как гетеротрофов, так и нефтедеструкторов увеличилась на несколько порядков.

3.15.3 Степень деструкции нефти биопрепаратами «ВиО», «Биоойл-СН» и «Биоойл-Югра», ассоциированными с ячменем в условиях реального разлива нефти

Оценку степени деструкции нефти на участках, обработанных биопрепаратами «ВиО», «Биоойл-СН» и «Биоойл-Югра» проводили дважды в течение двух месяцев (Рис.91). К концу первого месяца эксперимента наибольшая степень деструкции была отмечена на сайте, обработанном «ВиО» и составила 80%. При интродукции в почву биопрепаратов «Биоойл-СН» и «Биоойл-Югра» степень деградации нефти составила 55% и 60% соответственно. Через 2 месяца эксперимента (Рис. 92) наиболее эффективным также оказался «ВиО», степень деструкции нефти составила 89%, тогда как этот показатель для сайтов, обработанных биопрепаратами фирмы ЗАО «Биоойл» составил 70-75%. Деградация нефти на контрольном участке без внесения растительно-микробных ассоциаций составила 36 %. Можно отметить, что для «ВиО» практически максимальная эффективность была достигнута уже через месяц после обработки загрязненного участка.

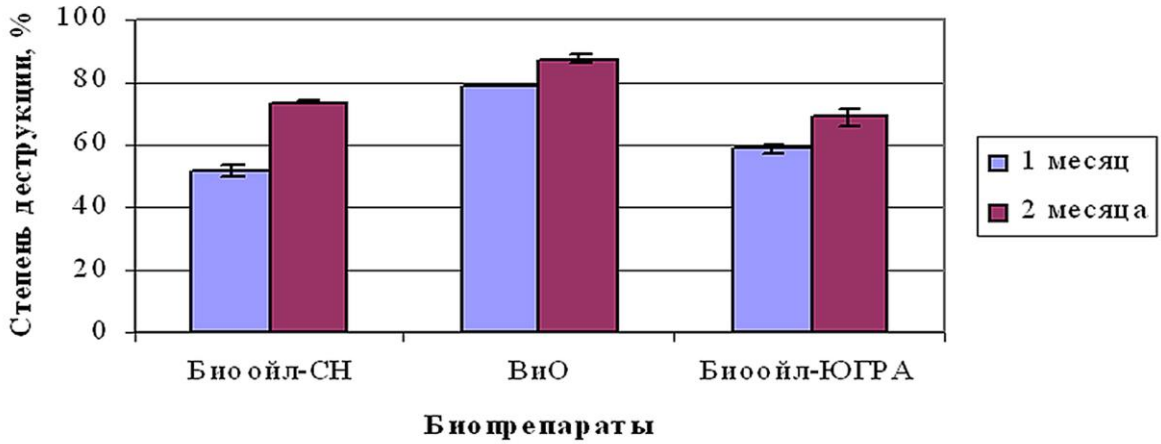


Рис. 91. Эффективность использования растительно-микробных ассоциаций для деградации нефти в почве

Рис. 92 Фотосъемка участка до обработки и через 2 месяца после обработки микробно-растительными ассоциациями.

Положительное заключение ЗАО «Биоойл» и ООО «Газпромнефть-Ноябрьскнефтегаз» об эффективности деградации нефти ассоциацией «ВиО» в полевых испытаниях прилагаются (Приложение 3). Кроме того, эффективность деградации нефти и нефтепродуктов микробным консорциумом «ВиО» была продемонстрирована в лабораторных испытаниях ООО «Газпромнефть–Восток» и ООО «Сибнефть Восток» (Приложение 3).

3.16 Депонирование штаммов, изучение их патогенности, патенты и товарный знак

3.16.1. Депонирование штаммов

Изученные штаммы наиболее активных микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти, входящие в состав опытного образца биопрепарата

«Микробак», были паспортизованы и депонированы во Всероссийскую Коллекцию Микроорганизмов под следующими номерами:

Rhodococcus sp. X5 — ВКМ Ac-2532Д,

Rhodococcus sp. S67 — ВКМ Ac-2533Д,

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

Pseudomonas putida BS3701(pBS1141, pBS1142) — ВКМ B-2380Д.

Штаммы микроорганизмов, входящие в состав опытного образца биопрепарата «ВиО», были депонированы в коллекции культур микроорганизмов Научно исследовательского института Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» под следующими номерами: *Acinetobacter baumannii* 1B — B1075; *Acinetobacter baumannii* 7 — B1073; *Rhodococcus erythropolis* S26 - B1072; *Pseudomonas putida* F701 — B1074.

Свидетельства о депонировании штаммов прилагаются (Приложение 1, 4, 5).

3.16.2 Изучение патогенности микроорганизмов

Штаммы, входящие в состав опытного образца биопрепарата «Микробак», прошли санитарно-гигиеническую оценку в Научно-Исследовательском Центре Токсикологии и Гигиенической Регламентации Биопрепаратов, в опытах на лабораторных животных были оценены показатели вирулентности, токсичности, токсигенности и диссеминации, на основании чего штаммы были отнесены к 4 классу опасности микроорганизмов (не патогенные) и удовлетворяют требованиям, предъявляемым к промышленным микроорганизмам. (Приложение 6).

Штаммы, входящие в состав опытного образца биопрепарата «ВиО», прошли санитарно-гигиеническую оценку в ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «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 4 классу опасности микроорганизмов (малоопасны) и удовлетворяют требованиям, предъявляемым к промышленным микроорганизмам. (Приложение 7).

3.16.3 Патенты и товарный знак

По результатам работы получены 5 патентов РФ на штамм микроорганизмов, ассоциацию микроорганизмов, биопрепарат, способ получения и применения, а также

на способ получения сухой формы биопрепарата и способ активации сухой формы биопрепарата для очистки нефтезагрязненных грунтов. (Приложение 1):

1. 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. Опубл. 10.01.2015. Бюл. № 1.

2. 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. Опубл. 20.11.2011. Бюл. № 32.

3. 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. Опубл. 10.01.2010. Бюл. № 1.

4. 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. Опубл. 20.01.2009. Бюл. № 2.

5. 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. Опубл. 20.12.2007. Бюл. № 35.

Зарегистрирован товарный знак биопрепарата «МикроБак». (Приложение 1).

3.16.4 Биопрепарат «МикроБак»: тосиколого-гигиеническая экспертиза, Технические условия, Экспертное заключение Роспотребнадзора и Сертификат соответствия

Получено экспертное научно-исследовательское заключение Научно-Исследовательского Центра Токсикологии и Гигиенической Регламентации Биопрепаратов по токсиколого-гигиенической оценке микробиологического препарата «МикроБак» (Приложение 8). Были разработаны Технические условия на сухую и жидкую форму биопрепарата «МикроБак». Федеральным агенством по техническому регулированию и метрологии ФГУП «Стандартинформ» Технические условия на препарат «МикроБак» зарегистрированы и внесены в реестр (Приложение 9).

По результатам полевых испытаний получено Заключение АФ ООО «Запказплюс холдинг» об эффективности биопрепаратов «МикроБак» и «ВиО» при очистке почв, загрязненных нефтешламами и буровыми шламами на территории месторождения «Северные Бузачи», Республика Казахстан. Эффективность очистки нефтезагрязненных почв составила 60 – 80%. (Приложение 1).

Сертификация продукции в России проводится на соответствие установленным стандартам качества, а итоговыми документами служат: сертификат соответствия, декларации о соответствии, свидетельство о государственной регистрации и пожарный сертификат. В соответствии с Постановлением Правительства РФ №982 от 2009 г. утверждены перечни товаров, подлежащих сертификации или декларированию. Однако биопрепараты для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений не входят ни в один из перечней. Поэтому на них может быть оформлен добровольный сертификат. С 1 июля 2010 г. вместо санитарно-эпидемиологического заключения, выдаваемого Центрами гигиены и эпидемиологии, проводится санитарно-гигиеническая экспертиза продукции на соответствие 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, и выдается соответствующее экспертное заключение Роспотребнадзора. Биопрепарат «Микробак» прошел такую экспертизу: получено экспертное заключение о соответствии его требованиям Комиссии таможенного союза, и таким образом он может применяться на территориях Российской Федерации, Республики Беларусь и Республики Казахстан (Приложение 10).

На биопрепарат «Микробак» также оформлен Сертификат соответствия. (Приложение 11).

4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Изучение и характеристика активных микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти

Окисление углеводородов нефти природными микробными популяциями представляет один из основных механизмов, с помощью которого нефть может быть деградирована или трансформирована в окружающей среде.

Микроорганизмы, способные утилизировать углеводороды нефти, являются представителями различных таксономических групп (Квасников и Ключникова, 1981). К ним относятся различные виды микромицетов, дрожжей и бактерий. Описано более 20 родов бактерий и более 10 родов грибов, способных к биодеградации различных нефтяных углеводородов (Барышникова и др., 2001). В сообществе микроорганизмов-деструкторов преобладают бактерии, так как использование углеводородов (особенно с длинной углеводородной цепью) среди бактерий распространено особенно широко (Логинов и др., 2000). Наиболее распространенными углеводородокисляющими родами бактерий в почве являются *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Collimonas*, *Corinebacterium*, *Dietzia*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Variovorax*, кроме того, некоторые некультивируемые бактериальные клоны также способны к расщеплению углеводородов (Hamamura et al., 2006; Chikere et al., 2009a; Obayori and Salam, 2010).

Известно, что эффективность деградации углеводородов нефти микроорганизмами зависит от многих физико-химических и биологических факторов, таких как наличие питательных веществ, температура окружающей среды, доступность кислорода и значение pH среды; биодоступность субстрата, концентрация и тип поллютанта; численность и разнообразие присутствующих микробных популяций, а также свойств почвы (Thomassin-Lacroix et al., 2002; Delille et al., 2007).

4.1.1. Выбор и характеристика активных микроорганизмов, способных разлагать углеводороды нефти при пониженных температурах

Поскольку в настоящее время не существует общепринятых критериев отбора (концепции выбора) штаммов-нефтедеструкторов для использования в составе биопрепаратов для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений в условиях

холодного и умеренного климата, при скрининге исследуемых штаммов нами были выбраны для изучения наиболее важные, на наш взгляд, их свойства :

Способность к деградации углеводородов нефти при низких температурах (2 - 4°С)

Температура является одним из наиболее важных факторов регулирования микробного метаболизма, который обеспечивает эффективность биоремедиации *in situ*. Так как большая часть разрабатываемых российских месторождений нефти находится в северных регионах (республика Коми, Западная Сибирь), существует проблема очистки почв в условиях низких температур. Биодоступность и растворимость гидрофобных, плохо растворимых в воде субстратов, таких как алифатические и ароматические углеводороды нефти, также зависят от температуры. Понижение температуры увеличивает их вязкость, при этом уменьшается скорость диффузии органических компонентов, и, следовательно, их биодоступность для микроорганизмов.

Ранее было показано, что микроорганизмы, выделенные из арктических и антарктических регионов, способны к деградации дизельного топлива, моно-, диароматических углеводородов (бензол, толуол, мета-ксилол, пара-ксилол, 1,2,4-триметилбензол, метилнафталин), линейных алканов, входящих в состав нефти, в диапазоне температур от 1 до 30°С. Эти микроорганизмы являлись психротрофными с оптимальной температурой роста 15 - 22°С (Ferguson et al., 2003; Kato et al., 2001).

Поскольку целью данной работы являлось создание ассоциации активных психротрофных микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений, на первом этапе работы проводили выбор и характеристику активных штаммов-деструкторов нефтепродуктов. В результате проверки 165 микроорганизмов-деструкторов было отобрано 9 наиболее активных микроорганизмов, способных утилизировать дизельное топливо, нефть и ПАУ как при 24°С, так и при 4°С, т.е. эти микроорганизмы являлись психротрофными: *Rhodococcus* sp. S25, *Rhodococcus* sp. S26, *Rhodococcus* sp. S67, *Rhodococcus* sp. X5, *Rhodococcus* sp. X25, *Rhodococcus* sp. Ars38, *Microbacrerium* sp. Ars25, *Pseudomonas fluorescens* 142NF(pNF142), *Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142).

В настоящее время известно всего несколько работ, посвященных выделению и изучению психротрофных микроорганизмов-деструкторов углеводородов, способных к эффективной деградации нефти и нефтепродуктов при пониженной температуре. Ранее Белоусовой с соавт. (Белоусова и др., 2002) было показано, что степень

деструкции нефти отдельными штаммами микроорганизмов при 4°С может быть выше, чем при 24°С. Вайт с соавторами (Whyte et al., 1997) изучали способность двух штаммов псевдомонад к деградации C_5- C_{12} алканов, толуола и нафталина при 5 и 25ºС. Было показано, что один штамм способен утилизировать октан и толуол при 5ºС лучше, чем при 25ºС. Эти же авторы (Whyte et al., 1998) описали ещё один психротрофный штамм *Rhodococcus* sp. Q15, который при 5ºС деградировал короткоцепочечные алканы - додекан (C_{12}) и гексадекан (C_{16}) в большей степени, чем длинноцепочечные алканы - октакозан (C_{28}) и дотриаконтан (C_{32}). Через 28 суток роста при 5ºС в жидкой минеральной среде в присутствии 0,1% дизельного топлива данный штамм деградировал почти все н-алканы (C_{10}- C_{21}) и в меньшей степени – разветвлённые алканы, присутствующие в дизельном топливе.

В нашей работе было показано, что у 6 отобранных психротрофных микроорганизмов-деструкторов нефти и мазута степень деструкции нефти при 4ºС выше, чем при 24ºС (Рис. 15) и составляла от 15 до 26% при 24°С и от 28 до 47% при 4°С. Таким образом, данные микроорганизмы перспективны для биоремедиации в условиях холодного климата и были использованы в дальнейшей работе при составлении ассоциаций штаммов-нефтедеструкторов.

Нефть и нефтепродукты являются сложными, многокомпонентными загрязнителями окружающей среды, содержащими несколько сотен различных химических соединений. Легкокипящие фракции нефти легко испаряются с поверхности почвы (в летний период - до 15%), в то время как тяжёлые фракции (асфальтены и смолы) практически не выветриваются и медленно проникают вглубь почвы (Shukla et al., 1990). В связи с этим очевидна необходимость выделения и изучения микроорганизмов-деструкторов различных фракций нефти. Применение фракционирования на оксиде алюминия позволяет разделить остаточную нефть на три условные фракции: гексановую – содержит парафино-нафтеновые и ароматические углеводороды; бензольную – полициклические ароматические углеводороды (бензольные смолы); спирто-бензольную – нафтеновые кислоты, спирто-бензольные смолы. Из полученных нами данных (табл. 6) видно, что родококки наиболее эффективно утилизируют лёгкую фракцию нефти, т.е. потребляют в н-алканы с различной длиной углеродной цепи. Псевдомонады утилизируют как углеводороды, входящие в состав бензольной фракции, так и компоненты бензольно-спиртовой фракции, в том числе моно- и полиароматические углеводороды. Полученные данные (табл. 6) иллюстрируют избирательную способность изучаемых микроорганизмов-

деструкторов в отношении деградации отдельных фракций нефти, что необходимо учитывать в процессе отбора эффективных штаммов при составлении ассоциаций микроорганизмов-деструкторов как основы биопрепаратов для очистки от нефтяных загрязнений.

Галотолерантность – способность к деградации углеводородов нефти при наличии в среде до 5% соли

Нередко в процессе нефтедобычи, в частности на месторождениях Западной Сибири происходит загрязнение болот нефтью и пластовыми водами, имеющими высокий уровень солёности. Биодеградация в условиях повышенной концентрации соли актуальна при биоремедиации морских побережий и акваторий, а также при очистке промышленных сточных вод, содержащих ароматические или хлорированные углеводороды.

В работе (Звягинцевой и др., 2001) установлена зависимость деструкции нефтяных масел культурами *Rhodococcus erythropolis* и *Dietzia maris* от концентрации NaCl в среде. Оптимальные значения солёности для утилизации турбинного масла составляли от 0,5 до 5% NaCl для исследуемых штаммов, минеральное масло и смесь парафинов (C_{14}-C_{18}) утилизировались в более широком диапазоне солёности среды.

Так как одним из факторов, лимитирующих биодеградацию углеводородов нефти в местах загрязнения, является повышенное содержание соли, в состав биопрепаратов, по-видимому, должны входить галотолерантные микроорганизмы-деструкторы. Поэтому мы отобрали девять штаммов, способных к деградации нефти и дизельного топлива в присутствии 3-5% NaCl (табл. 3).

Продуцирование эффективных биоПАВ

Одной из причин высокой устойчивости нефтепродуктов в окружающей среде является их ограниченная растворимость в водных средах. Поэтому такие соединения малодоступны для микроорганизмов и с трудом подвергаются биодеградации. Однако известно, что при культивировании в минеральных средах с использованием в качестве источника углерода и энергии различных нефтепродуктов, некоторые микроорганизмы синтезируют биоэмульгаторы, повышающие эффективность биоутилизации. Биоэмульгаторами также могут быть промежуточные продукты биодеструкции поллютантов (Desai and Banat,1997). Ранее показано, что максимальная эмульгирующая способность микроорганизмов проявлялась через 12-30 часов культивирования (Maneerat and Dikit, 2007; Lee et al., 2006). Поэтому в нашей работе для оценки эмульгирующей активности штаммов определяли индекс эмульгирования

через 24 часа (E_{24}) после выращивания штаммов на гидрофобном субстрате. Наибольшие значения индекса эмульгирования были получены для родококков по сравнению с псевдомонадами и составляли 75 и 77,5% для штаммов *Rhodococcus* sp. X5 и *Rhodococcus* sp. S67, соответственно (Табл. 5) и были выше, чем, например, в работе Мэнира и Дикита (Maneerat and Dikit, 2007), в которой индекс эмульгирования для микроорганизма Myroides sp. SM1 составлял 62%. Индекс эмульгирования (E_{24}) клеточной суспензии *Gordonia alkanivorans* CC-JG39 составлял 20% для керосина и 17% для дизельного топлива (Lin et al., 2005). Оценка эмульгирующей активности с помощью индекса эмульгирования позволяет определить способность бактерий к эмульгированию гидрофобных соединений и является удобным методом для скрининга штаммов.

Из всех исследованных нами штаммов наилучшими продуцентами внеклеточных биоэмульгаторов были представители рода *Rhodococcus*. Наиболее активными продуцентами внеклеточных биоэмульгаторов оказались штаммы *Rhodococcus sp.* X5, *Rhodococcus sp.* S67 и *Rhodococcus sp.* X25 (Табл. 4)

С помощью световой и электронной микроскопии изучали клетки родококков и псевдомонад, имеющих различное строение клеточной стенки, при росте в среде с сырой нефтью. По характеру взаимодействия с нефтью грамотрицательные клетки псевдомонад и грамположительные клетки родококков существенно различаются: клетки родококков находятся внутри капель нефти, а псевдомонады локализованы на их поверхности (Рис. 10). Это соответствует ранее полученным данным (Звягинцева с соавт., 2001) показавшим, что при культивировании *Rhodococcus erythropolis* происходит адгезия клеток на поверхности капли нефтяного масла, а затем и колонизация внутреннего объема капли.

Электронно-микроскопические исследования показали, что клетки *Pseudomonas* и *Rhodococcus* при росте на гидрофильном субстрате (глюкозе) и гидрофобном субстрате (нефти) имеют значительные различия (Рис.11 и 12) При культивировании на нефти на поверхности клеток и во внеклеточном пространстве образуются фибриллярные компоненты – экзоцеллюлярные плёнки. По мнению Дезай с соавторами (Desai et al., 1993) такие экзоцеллюлярные вещества могут являться эмульгаторами, образующимися при росте микроорганизмов на таких гидрофобных субстратах, как гексадекан, дизельное топливо, нефть. Цитохимическая реакция на полисахариды (взаимодействие с рутением красным) показала, что компонентом экзоцеллюлярных плёнок (ЭЦП) являются полисахариды (Рис. 11 и 12). Причём, полисахариды, входящие в состав многих биоэмульгаторов, отмечены не только у

штамма *Rhodococcus* S67, но и у *Pseudomonas putida* BS3701. Ранее в работе Вайта с соавт. (Whyte et al., 1999) было отмечено, что штамм *Rhodococcus* sp. Q15 при росте на гексадекане или дизельном топливе даже при 5ºС продуцировал биоэмульгаторы. Гидрофобные свойства клеток родококков и уменьшение межфазного натяжения авторы связывают с синтезом экзополисахаридов, которые в виде слизистых капсул окружает клетки бактерий.

В нашей работе в процессе деструкции нефти ассоциацией штаммов *Pseudomonas – Rhodococcus*, продуцирующими биоэмульгаторы в культуральную жидкость, также наблюдалось образование экзоцеллюлярных плёнок (Рис. 12).

Ван Хамэ и Вард (Van Hamme and Ward, 2001) изучали физиологические и метаболические взаимодействия двух микроорганизмов *Rhodococcus* sp. F9-D79 и *Pseudomonas* sp. JA5-B45 при культивировании в среде с нефтью. Родококки адгезировались в интерфазе нефть-вода и продуцировали миколовую капсулу (один из известных биоПАВ), а псевдомонады росли в водной фазе и были не способны эмульгировать нефть. Однако в смешанной культуре этих двух бактерий происходило образование стабильной эмульсии.

Наличие капсулярных компонентов в смешанных микробных популяциях приводит к флоккуляции и гранулообразованию (Дмитриев с соавт., 1993), в результате чего достигается эффект искусственного структурирования микробных ассоциаций, наличие в одной и той же грануле метаболически связанных различных видов микроорганизмов. Преимущества такой формы консорциумов очевидны, так как при интродукции чистых культур микроорганизмов в природную среду (воду, нефтяные пласты, илы и т.д.) отрицательную роль играет фактор пространственного разобщения микробных клеток.

В процессе деструкции нефти гидрофильные клетки псевдомонад находятся в водной фазе и на поверхности нефтяных капель, а гидрофобные клетки родококков – внутри капель нефти, таким образом, микробная атака нефтяных капель происходит как снаружи, так и изнутри (Рис. 93). Таким образом, включение в состав микробной ассоциации представителей родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* за счёт их разных механизмов потребления гидрофобных субстратов может повысить эффективность деградации нефти и нефтепродуктов.

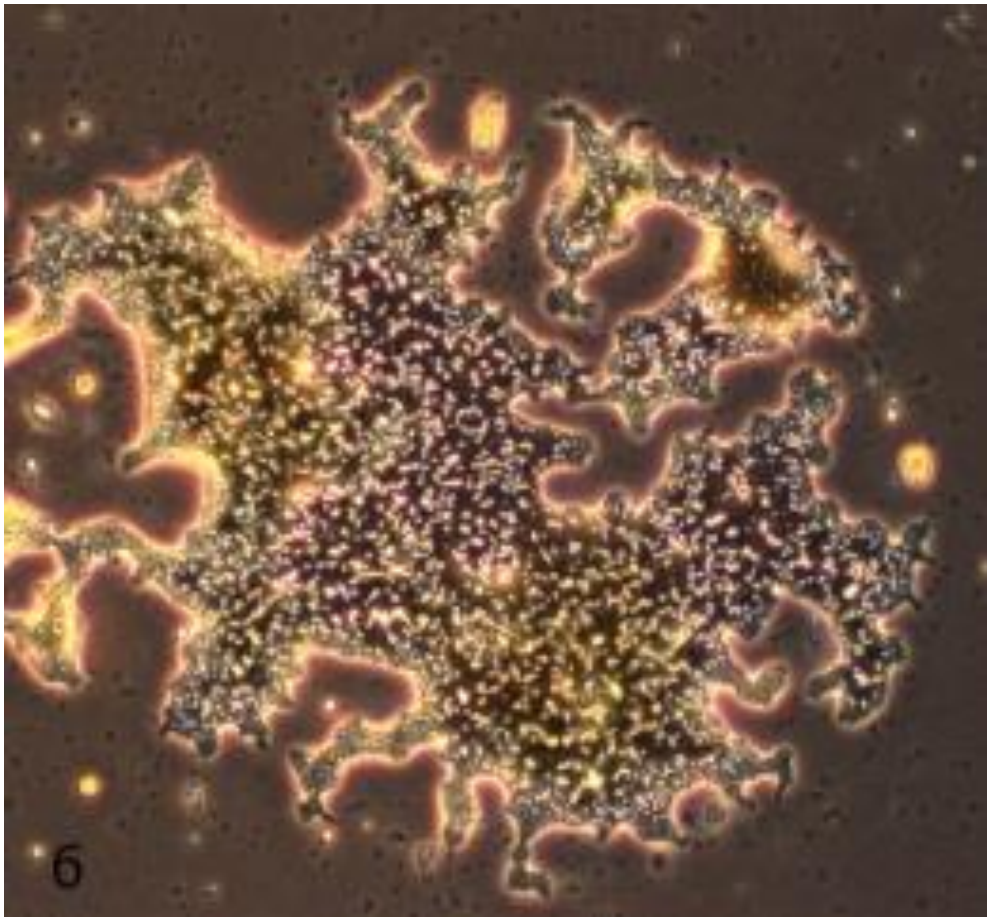


Рис. 93 Деструкция нефтяной капли смешанной ассоциацией Pseudomonas - Rhodococcus (световая микроскопия).

Наличие катаболических плазмид

Как известно, процесс деградации ароматических углеводородов, входящих в состав нефти, часто контролируется плазмидами, причём большинство из них обнаружено в бактериях рода *Pseudomonas*. Плазмиды играют существенную роль в адаптации микроорганизмов к изменяющимся условиям окружающей среды. Эти микробные системы позволяют микроорганизмам использовать моно- и полициклические ароматические углеводороды, которые, чаще всего, недоступны для большинства бактерий. Для исследованных штаммов псевдомонад данный факт (способность утилизировать как углеводороды, входящие в состав бензольной фракции, так и компоненты бензольно-спиртовой фракции, в том числе моно- и полиароматические углеводороды) можно объяснить не только их субстратной специфичностью, но и наличием в составе *Pseudomonas* sp. 142NF(pNF142) и *Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142) плазмид биодеградации нафталина.

Совместимость в составе ассоциации

Многие микроорганизмы в процессе жизнедеятельности выделяют различные бактерицидные и бактериостатические вещества, ингибирующие рост других микробов и обеспечивающие их продуцентам селективное преимущество в определённых экологических нишах. Известно, что некоторые биосурфактанты, продуцируемые бациллами (грамицидины и полимиксины), являются антибиотиками (Kvitko et al., 2001; Mogi et al., 2000), а рамнолипиды ингибируют рост различных бактерий и грибов (Itoh et al. 1971; Vatsa et al. 2010).

Исследованные нами микроорганизмы-нефтедеструкторы не ингибировали рост друг друга при культивировании в смешанной ассоциации (данные разделов 3.5, 3.6 и 3.8, Рис. 61, 65, 69).

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.

4.1.2 Выбор и характеристика микроорганизмов-нефтедеструкторов по способности к деградации высоких концентраций нефти, при повышенных концентрациях морской соли и в широком диапазоне pH

7 штаммов бактерий из коллекции лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН и 10 бактерий из коллекции ЗАО «Биоойл» (всего 17 штаммов - табл.15) проверяли на способность к деградации высоких концентраций нефти (до 40%) при повышенных концентрациях морской соли (до 10%) в широком диапазоне pH (4–10) в жидкой минеральной среде. Критерии первичного отбора и отобранные штаммы обобщены в табл. 43.

Все исследованные штаммы были способны к росту на дизельном топливе (2%) в присутствии 5% соли, штаммы 142NF и 2B — в присутствии 7%, и только штамм X5 — при 10%. Микроорганизмы S25, S26 и F701 способны деградировать ДТ (2%) в диапазоне pH 5–8, а бактерии 1B, 2A, 6 и 7 — в диапазоне pH 4–10. Штаммы 1B, 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, 1B, 6 и F701, а при 4°C — только у микроорганизма S26. В присутствии 3% соли и ДТ в концентрации 40% рост наблюдался у штаммов F701,1B, S26, 2C и 6 при 24°C, и у штаммов 1B и S26 — при 4°C. Наиболее высокая эмульгирующая активность отмечена у штаммов F701, S67, X5, S26, 7 и 1B (Табл. 18).

Табл. 51. Критерии первичного отбора микроорганизмов-деструкторов – способность к росту и деградации углеводородов нефти в следующих условиях:

Критерии отбора	**Отобранные штаммы**
pH среды 4–10	1B, 2A, 6, 7
7% NaCl	2B, X5, 142NF
температура 4–42°C	1B, 6, 7, S25, S26, F701
концентрация нефти 40% при 24°C	1B, 6, S25, S26, F701
концентрация нефти 30% при 4°C	6, 7, S26
концентрация дизельного топлива 40%, соли 3% при 24°C	1B, 2C, 6, S26, F701
концентрация дизельного топлива 30%, соли 3% при 4°C	1B, 6, 7, S26, F701

Дальнейшие эксперименты показали, что микроорганизмы 1B, 6, 7, F701, S26, S25 были способны к деградации высоких концентраций нефти и нефтепродуктов (до 30%) в присутствии 3% морской соли в диапазоне температур 4–42°C и pH 4–10. Это предполагает возможность их использования в засоленных природных условиях (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 (Gemmell and Knowlas, 2000), что также характерно для месторождений нефти в Западной Сибири, выявленная у исследуемых штаммов способность к деструкции нефтяных углеводородов в кислой среде может использоваться для биоремедиации нефтязагрязненных объектов, характеризующихся повышенной кислотностью.

После определения основных физиолого-морфологических характеристик штаммов, была проведена идентификация наиболее активных микроорганизмов-нефтедеструкторов, которые на основании секвенирования генов 16s РНК были определены как 1B и 7 — *Acinetobacter baumannii*, 6 — Serratia sp. Таксономическая принадлежность других штаммов приведена в таблице 7.

В результате скрининга 17 исследуемых бактерий обнаружены плазмиды у 8 штаммов-деструкторов: *Rhodococcus* sp. X25, *Rhodococcus* sp. S25, *Pseudomonas putida*

F701, *Acinetobacter baumannii* 7, *Rhodococcus* sp. S67, *Acinetobacter baumannii* 1B, *Rhodococcus erythropolis* S26, штамм 4 (рис. 7). Плазмида биодеградации нафталина pNF142 в штамме *Pseudomonas* sp. 142NF(pNF142), описана ранее (Gomes et al., 2005).

Было установлено, что микроорганизмы 7 и F701 содержат конъюгативные катаболические плазмиды и, таким образом, способны увеличивать деградативный потенциал почвенных микробных популяций за счет распространения генов среди аборигенных бактерий. Вопрос о конъюгативности плазмид микроорганизмов 1B, 4, S25, 6 и S26 остается открытым, однако они также могут участвовать в распространении катаболических генов, например, путем трансформации. При этом клетка-хозяин погибает и лизируется, ДНК с катаболическими генами попадает в окружающую среду и некоторое время может в ней сохраняться, а при контакте с подходящим новым бактериальным хозяином путем трансформации ДНК может встраиваться в генетическую систему микробной клетки (Прозоров, 1999). Поэтому, включение в состав биопрепарата микроорганизмов, содержащих конъюгативные или неконъюгативные плазмиды биодеградации, представляется новым и перспективным аспектом при разработке новых технологий биоремедиации.

Не менее важным свойством микроорганизмов является их способность к колонизации корней растений, что может обеспечить выживаемость и конкурентоспособность интродуцированных в почву штаммов. Микроорганизмы *Rhodococcus erythropolis* S26, *Acinetobacter baumannii* 1B, *Acinetobacter baumannii* 7 и *Pseudomonas putida* F701 способны колонизировать корни растений, их численность в ризоплане была на 1-2 порядка выше, чем в ризосфере (Рис. 81, 82, 85).

Таким образом, были разработаны критерии отбора (концепция выбора) штаммов-нефтедеструкторов для создания биопрепаратов для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений в условиях холодного и умеренного климата:

— способность к деградации высоких концентраций нефти или нефтепродуктов (30%) в широком диапазоне температур (от 2 до 42°C);
— устойчивость к изменениям значений pH (4–10);
— галотолерантность (до 5% NaCl);
— наличие катаболических плазмид;
— продуцирование эффективных биоПАВ;
— способность к колонизации корней растений;
— совместимость микроорганизмов в составе ассоциации.

Комбинация всех перечисленных ниже свойств микроорганизмов, наиболее важных для эффективной деградации углеводородов нефти, не присутствует ни в одном из известных биопрепаратов.

4.2 Влияние катаболических плазмид на биодеградацию углеводородов нефти

Описано много примеров участия плазмидных генов в деградации углеводородов, в том числе короткоцепочечных алканов, замещенных и незамещенных ароматических углеводородов и других ксенобиотиков (Sayler, 1990; Wallace et al., 1992; Harayma et al., 1990; Top et al., 2002). Ароматические соединения обычно составляют 10–30% углеводородов нефти, они являются наиболее опасными - токсичными и устойчивыми компонентами нефти и нефтепродуктов. Плазмиды биодеградации ароматических соединений часто являются конъюгативными и способны к горизонтальному переносу внутри и между бактериальными популяциями, расширяя деградативный потенциал микроорганизмов и способствуя их адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды (Кочетков, 1985). Поэтому можно предположить, что штаммы бактерий, содержащие плазмиды биодеградации ПАУ, могут увеличивать степень деструкции нефти по сравнению с бесплазмидными. Весьма вероятно участие плазмид в процессе деструкции нефти и нефтепродуктов, являющихся гетерогенными субстратами, содержащими широкий спектр углеводородов различных классов.

Для выявления роли катаболических плазмид в процессе биодеградации углеводородов нефти проводили изучение утилизации нефти плазмидосодержащими штаммами-деструкторами рода *Pseudomonas* по сравнению с их бесплазмидными вариантами.

Деградацию нефти исследуемыми штаммами оценивали по суммарному показателю её убыли в жидкой минеральной среде, определяемому весовым методом (гравиметрия). Показано, что наличие плазмиды биодеградации нафталина pBS216 в штамме *P. chlororaphis* PCL1391 приводило к существенному увеличению (в 10 раз) степени деструкции нефти по сравнению с бесплазмидным микроорганизмом. Наличие плазмид pOV17 и pNF142::TnMod-OTc в этом же штамме не оказывало такого значительного эффекта (Рис.18).

Гены, кодирующие катехол-2,3-диоксигеназу, часто имеют плазмидную локализацию. Ранее было показано, что плазмиды биодеградации нафталина pBS216 и pOV17 структурно аналогичны, но существенно отличаются уровнем активности катехол-2,3-диоксигеназы (Anokhina et al., 2006), что может влиять на эффективность

деградации нефти одним и тем же бактериальным хозяином, несущим различные плазмиды. Присутствие плазмиды биодеградации нафталина pBS1141 в штамме *P. putida* BS3701 также приводило к увеличению (в 3 раза) степени деструкции нефти этим штаммом по сравнению со штаммом BS3701E, не содержащим данную плазмиду (Рис.18).

Как видно из полученных данных (Рис. 19, 20), плазмидосодержащие бактерии демонстрировали больший прирост биомассы клеток при росте на нефти по сравнению с бесплазмидными микроорганизмами. Наличие плазмидных генов биодеградации расширяет спектр утилизируемых субстратов бактерии-хозяина. Например, нафталиндиоксигеназа, кодируемая генами, входящими в состав плазмид биодеградации нафталина, катализирует порядка 76 реакций, (реакции диоксигенирования, монооксигенирования, дегидратации, O- и N- деалкилирования и сульфоокисления). Полученные нами результаты показывают, что важным аспектом катаболического потенциала микроорганизмов в процессе деструкции нефти является комбинация «бактериальный хозяин — плазмида». Полученные результаты также демонстрируют влияние хозяйского окружения на экспрессию плазмидных генов. Подобные результаты были получены Анохиной с соавт. (Anokhina et.al., 2006) при использовании гнотобиотических систем с растениями для изучения влияния плазмид биодеградации нафталина на физиологические характеристики ризосферных бактерий рода *Pseudomonas*. На основании проведенных исследований выявлено, что внесение структурно аналогичных плазмид биодеградации нафталина в однин и тот же штамм-хозяин приводит к появлению различий как в физиологических характеристиках бактерий, так и в отношении деградации углеводородов нефти.

Наличие плазмид в штаммах обусловило и изменение фракционного состава остаточной нефти (Табл. 22). Было обнаружено увеличение степени деструкции и изменение соотношения гексановой, бензольной или бензольно-спиртовой фракций, по сравнению с результатами, полученными при использовании бесплазмидных штаммов. Наибольшая деструкция парафинонафтеновых, моно- и полиароматических углеводородов, асфальтенов и смол показана для штамма *P. chlororaphis* PCL1391(pBS216), степень деградации трех основных фракций нефти этим штаммом составила 38%, 31% и 26%, соответственно, что обусловило наивысший показатель степени деструкции нефти (48%) в данном эксперименте (Рис.18).

Изучение деградации нефти в жидкой минеральной среде плазмидосодержащими и бесплазмидными штаммами-деструкторами толуола и камфары (разделы 3.2.2 и 3.2.3) также показало преимущество плазмидосодержащих

микроорганизмов над бесплазмидными вариантами как в отношении степени деградации нефти (Рис. 28), так и в отношении ростовых характеристик (прирост биомассы) (Рис. 29 и Рис. 30).

Изучение процесса биодеградации нефти плазмидосодержащими штаммами-деструкторами по сравнению с бесплазмидными бактериями проводили также в модельных почвенных системах в течение 8 недель. Было показано, что наличие плазмидных генов биодеградации ароматических соединений обеспечивает преимущество в приросте биомассы плазмидосодержащих штаммов по сравнению с их бесплазмидными вариантами, а степень деструкции нефти при интродукции плазмидосодержащих микроорганизмов увеличивалась в 2–3 раза, по сравнению с интродукцией бесплазмидных штаммов.

Как видно из данных рисунка 35, в процессе деградации нефти как в стерильной, так и в нестерильной почвенной системе наблюдался эффект при внесении плазмидосодержащих штаммов. Однако в нестерильной почве (рис. 35Б) степень деградации нефти интродуцированными плазмидосодержащими микроорганизмами была выше по сравнению со стерильной почвой (рис. 35А), инокулированной теми же бактериями. Данный факт можно объяснить наличием и активностью аборигенных микроорганизмов в почве, возможным горизонтальным переносом плазмид между интродуцированными плазмидосодержащими микроорганизмами и аборигенными бактериями, что ранее было описано в работах Top et.al., 1999. Обладающая катаболическими генами клетка-хозяин имеет очевидное преимущество перед остальными микроорганизмами, поскольку способность расщеплять поллютант выполняет роль защитного механизма и обеспечивает микроорганизм дополнительным источником углерода и энергии (Sarand, 2000). Хальером – Сулье с соавторами (Hallier-Soulier et al., 1999) путем конъюгационного переноса плазмид был получен штамм, в котором были совмещены гены, кодирующие следующие ферменты: бензол монооксигеназу, толуол диоксигеназу, катехол-2,3-диокигеназу, метилкатехол-2,3 диоксигеназу. Полученный трансконъюгант *P. putida* F1(pMX) был способен расти на бензоле, толуоле, м-ксилоле, п-ксилоле и этилбензоле в качестве единственных источников углерода. Причем катехол-2,3-диоксигеназа в полученном трансконъюганте обладала более широкой субстратной специфичностью по сравнению с донорной и реципиентной клетками. Это наглядно демонстрирует возможности увеличения деградативного потенциала микроорганизмов за счёт генетической рекомбинации, и в частности, путём конъюгационного переноса катаболичесих плазмид.

Таким образом, представляется целесообразным использование микроорганизмов-деструкторов, содержащих плазмиды биодеградации в составе биопрепаратов для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений.

4.3 Роль горизонтального переноса катаболических плазмид в процессе биодеградации ПАУ

Адаптация микроорганизмов к неблагоприятным условиями окружающей среды часто происходит благодаря экспрессии определенных генов, находящихся в составе плазмид. Широкое использование антибиотиков, тяжелых металлов и токсичных органических соединений техногенного характера обусловливает эволюцию микробных систем резистентности и биодеградации, часто кодируемых плазмидными генами, которые, могут распространяться между таксономически довольно отдаленными бактериями. Ранее было показано, что плазмиды биодеградации нафталина NPL-1 и NPL-41 и их транспозонные варианты pBS286 и pBS292 способны к переносу в штаммы *Pseudomonas aeruginosa, P. stutzeri, P. maltophila, P. glycinea, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Rhizobium meliloti, Agrobacterium tumefaciens, Serratia marcescens, Erwinia carotovora,* т.е. являются плазмидами с широким кругом бактериальных хозяев (Боронин, 1987; Кошелева и др. 1986). Загрязнение окружающей среды поллютантами создает сильное селективное давление и может приводить к появлению бактериальных штаммов с новыми или расширенными деградативными возможностями. При этом мобильные генетические элементы (МГЭ), такие как плазмиды и транспозоны, делают возможным распространение генов биодеградации в микробных сообществах.

4.3.1 Конструирование маркированных штаммов-деструкторов *P. putida* KT2442(pNF142::Tn*Mod*-OTc) и *P. putida* BS394(pNF142::Tn*Mod*-OTc) для изучения горизонтального переноса плазмид биодеградации нафталина

В исследованиях горизонтального переноса генов и плазмид, как резистентности, так и биодеградации, часто применяются генетически маркированные штаммы и плазмиды. Однако, инсерции репортерных генов могут приводить к нарушению функций плазмидных генов, поэтому необходимым этапом исследований является проверка стабильности меченой плазмиды и экспрессии плазмидных генов. Ранее репортерный ген флюоресценции *gfp* в составе плазмиды был использован для мониторинга переноса катаболической TOL-плазмиды на агаризованных средах (Christensen et al., 1998). Также были опубликованы работы, в которых одновременно

использовали хромосомный репортерный ген красной флюоресценции *ds-Red* для мониторинга донорного штамма и плазмидный ген зеленой флюоресценции *gfp* – для мониторинга возникновения трансконъюгантов (Nancharajah et al., 2003; Mølbak et al., 2003). В этих работах изучали перенос плазмиды биодеградации толуола pWW0 на агаризованной среде (Nancharajah et al., 2003) и в биореакторе, а также исследовали перенос плазмид pWW0 и pJKJ5, содержащей ген резистентности к тетрациклину, – на поверхности проростков растений (Mølbak et al., 2003).

В нашей работе был сконструирован (Рис. 27) маркированный штамм – деструктор нафталина *P. putida* KT2442(pNF142::Tn*Mod*-OTc), содержащий меченую плазмиду биодеградации. Наличие хромосомных репортерных генов *gfp* и резистентности к канамицину и рифампицину, а также генов биодеградации нафталина и резистентности к тетрациклину в составе плазмиды позволило не только проследить за судьбой микроорганизма, но и исследовать перенос плазмиды как в лабораторных условиях, так и в открытой окружающей среде.

Известно, что плазмиды биодеградации, как правило, имеют большие размеры (Boronin, 1992) и не всегда стабильно поддерживаются в новом хозяйском окружении (Филонов и Боронин, 1990). Маркированная плазмида pNF142::Tn*Mod*-OTc стабильна в клетках *P. putida* KT2442 и *P. putida* BS394 при культивировании в неселективных условиях. Определение удельных скоростей роста ряда трансконъюгантов в условиях периодического культивирования на нафталине показало, что ростовые параметры сконструированных и исходных штаммов сходны; трансконъюгантный штамм KT2442(pNF142::Tn*Mod*-OTc)-клон 5 демонстрировал большую скорость роста на нафталине (Рис. 37) по сравнению с природными штаммами 142NF(pNF142) и G7(NAH7). Таким образом, встройка мини-транспозона Tn*Mod*-OTc не повлияла на экспрессию генов катаболизма нафталина в составе плазмиды pNF142 и на стабильность её поддержания в хозяйском штамме.

4.3.2 Горизонтальный перенос плазмид биодеградации нафталина в почве в лабораторных условиях

Первые работы по изучению горизонтального переноса плазмид были выполнены с использованием плазмид антибиотикорезистентности (Trevors and Berg, 1989) и резистентности к тяжелым металлам (De Rore et al., 1994a), что обусловлено методической простотой мониторинга таких плазмид. Работы по изучению переноса катаболических плазмид были начаты несколько позже, но к настоящему времени достаточно многочисленны. Был изучен перенос плазмид катаболизма 2,4-

дихлорфеноксиацетата (Newby et al., 2000), 2,2-дихлорпропионата (Brokamp and Schmidt, 1991), толуола (Ramos-Gonzalez et al., 1991). Исследовали эффект инокуляции деструкторов органических соединений в почву и активный ил, а также диссеминацию катаболических плазмид среди аборигенных микроорганизмов (Brokamp and Schmidt, 1991; Nüβlein et al., 1992; Crowley et al., 1996; DiGiovanni et al., 1996; Top et al., 1999; 2000). Однако работы, в которых одновременно изучали бы биодеградацию ПАУ и сопряженный с ней перенос деградативных плазмид, в литературе отсутствуют.

В проведенных ранее исследованиях процессов деструкции ксенобиотиков и горизонтального переноса деградативных плазмид в лабораторных условиях использовали доноров – активных деструкторов загрязнителей, главным образом грамотрицательные микроорганизмы родов *Pseudomonas* (Nüβlein et al., 1992; Crowley et al., 1996) и *Alcaligenes* (DiGiovanni et al., 1996; Brokamp, Schmidt, 1991). Донорные штаммы содержали плазмиды биодеградации 2,2-дихлорпропионата pFL140 (Brokamp and Schmidt, 1991), 3-хлорбензоата, 4-метилбензоата и 4-этилбензоата pFRC20 и pWW0-EB62 (Nüβlein et al., 1992), 2,5-дихлорбензоата pPB111 (Crowley et al., 1996), 2,4-дихлорфеноксиацетата pJP4 (DiGiovanni et al., 1996; Top et al., 1999; 2000) и pEMT1k (Top et al., 1999; 2000). Реципиентами были как интродуцированные штаммы рода *Pseudomonas* (Nüβlein et al., 1992), так почвенные аборигенные микроорганизмы (Crowley et al., 1996; DiGiovanni et al., 1996; Top et al., 1999; 2000), а иногда и те и другие одновременно (Brokamp and Schmidt, 1991).

Топ с соавт. (Top et al., 1999; 2000), изучавшие главным образом влияние трансконъюгантов на процесс деструкции 2,4-дихлорфеноксиацетата, целенаправленно вносили в почву донора с низкой деструктивной активностью, которая, по всей видимости, была следствием нестабильности плазмиды биодеградации pEMT1k. Однако, было показано, что образующиеся трансконъюганты имели селективное преимущество, и их численность в популяции увеличивалась.

В нашей работе (схема эксперимента представлена на Рис. 38) в качестве донорного штамма использовали активного деструктора нафталина *P. putida* BS394(pNF142::Tn*Mod*-OTc), в котором катаболическая плазмида стабильно поддерживалась. В качестве реципиента интродуцировали бесплазмидный штамм *P. putida* KT2442, не способный к деградации нафталина. В опытной почве были обнаружены аборигенные деструкторы нафталина, которые могли служить как потенциальными реципиентами, так и донорами катаболических плазмид. Схема возможных направлений переноса катаболических плазмид в почве в лабораторных

условиях приведена на рисунке 42. Из четырех возможных направлений плазмидного переноса в нашей работе были подтверждены три.

В микрокосме 3 были обнаружены трансконъюгантные клоны интродуцированного бесплазмидного штамма KT2442, в который произошел конъюгационный перенос аборигенных плазмид деструкции нафталина. Ранее Смалла с соавторами (Smalla et al., 2000) осуществили экзогенную изоляцию плазмид путем скрещивания реципиента и аборигенных микроорганизмов (содержащихся в водной вытяжке из навоза) на богатой агаризованной среде. Экзогенная изоляция, таким образом, позволяет выделить плазмиды даже из некультивируемых микроорганизмов или же из штаммов, в которых плазмидные гены не экспрессируются. В нашей работе фактически была проведена эндогенная изоляция природных катаболических плазмид, которая заключается в интродукции бесплазмидных потенциальных реципиентов в опытную среду (почву) и последующем высеве бактерий из необходимых разведений на селективные среды для отбора трансконъюгантов, содержащие аборигенные плазмиды.

Поскольку численность аборигенных деструкторов нафталина в почве была на уровне 10^4-10^5 КОЕ/г сухой почвы, частота переноса аборигенных плазмид не могла быть ниже 10^{-5}-10^{-4} на клетку донора. Возможно в микрокосме 5 частота переноса меченой плазмиды из интродуцированного штамма-деструктора BS394(pNF142::Tn*Mod*-OTc) в аборигенные микроорганизмы была меньше 10^{-5} на клетку донора, поскольку выделить аборигенных трансконъюгантов не удалось. Кроме того, быстро достигнуть уровня обнаружения данные трансконъюганты, по всей видимости, не смогли, поскольку снижение селективного давления вследствие убыли нафталина было довольно быстрым: на 14 сутки количество нафталина составило около 13% от исходного (Рис. 41). В микрокосмах 4 и 5 был отмечен перенос меченой катаболической плазмиды pNF142::Tn*Mod*-OTc в бесплазмидный штамм-реципиент KT2442.

В микрокосмах 2-5 присутствие микроорганизмов-деструкторов ускоряло процесс биодеградации нафталина по сравнению с контрольным микрокосмом 1, в котором убыль поллютанта составила 42±4% на 14 сутки (Рис. 41). На 14 сутки наибольшая величина убыли нафталина 87±5% была отмечена в микрокосме 5 с нестерильной почвой и интродуцированными штаммами BS394(pNF142::Tn*Mod*-OTc) и KT2442.

Интересно отметить (Рис. 41), что в ходе наших экспериментов в нестерильной почве с интродуцированным штаммом KT2442 (микрокосм 3) процесс деградации

нафталина во второй половине эксперимента был быстрее, чем в аналогичной нестерильной почве без этого штамма (микрокосм 2). Для того, чтобы определить причину ускорения убыли нафталина, в изученных штаммах была определена активность ключевых ферментов катаболизма нафталина. Активность салицилатгидроксилазы у трансконъюгантных клонов 35 и 36, получивших аборигенные катаболические плазмиды, была на порядок выше, чем у четырех аборигенных штаммов – деструкторов нафталина (табл. 22). Однако, у аборигенных микроорганизмов активность фермента деградации катехола К23О на порядок выше, чем у клона 35, и на три порядка выше, чем у клона 36. По-видимому, в микрокосме 3 имело место явление кооперации, когда клоны 35 и 36 разрушают нафталин до салицилата, а затем катехола намного быстрее, чем аборигенные деструкторы, которые, обладая высокими активностями К23О, способны быстро разрушать катехол с последующим включением интермедиатов в цикл Кребса. Этот факт подтверждает ранее высказанное (Filonov et al., 2004) предположение о возможности двухстадийного процесса утилизации нафталина плазмидосодержащими бактериями в почве.

Для проверки предположения о возможной кооперации аборигенных штаммов-деструкторов нафталина и трансконъюгантов, образовавшихся в ходе эксперимента и способных также утилизировать поллютант, был проведен эксперимент в жидкой минимальной среде. Было показано (Рис. 43), что трансконъюгантый штамм КТ2442(pA) клон 35, присутствуя в концентрации в 10 раз меньшей (на 15-е сутки эксперимента) по сравнению с находившимся в той же системе почвенным штаммом-деструктором нафталина, способствует более быстрому накоплению в среде интермедиата деструкции нафталина – салицилата (в два раза быстрее) и его дальнейшему быстрому потреблению (Рис. 43). Таким образом, наличие в микрокосме 3 трансконъюгантов штамма КТ2442. получивших аборигенные плазмиды биодеградации, по-видимому, обеспечило небольшое (на 11%), но достоверное ускорение деструкции нафталина по сравнению с микрокосмом 2. Ранее было показано, что перенос плазмид биодеградации 2,4-дихлорфеноксиацетата в подходящие адаптированные аборигенные бактерии в почве ускоряет деградацию этого поллютанта (Top et al., 1999). Полученные нами результаты демонстрируют другой интересный эффект: интродукция бесплазмидного лабораторного штамма и последующий перенос в него аборигенных катаболических плазмид может создавать условия для ускорения деструкции нафталина в почве.

Следует отметить, что численность донорного штамма BS394(pNF142::Tn*Mod*-OTc) в стерильной почве (микрокосм 4) была на порядок выше по сравнению с его численностью в нестерильной почве (микрокосм 5) (Рис. 40). Данный факт может объясняться как увеличением количества легкоусвояемой органики после стерилизации почвы за счет разрушения высокомолекулярных органических веществ, клеток микроорганизмов, так и конкурентным взаимодействием между интродуцированными и аборигенными микроорганизмами в нестерильной почве. Де Рор с соавт. (De Rore et al., 1994a), изучавшие перенос плазмиды устойчивости к тяжелым металлам pDN705, показали, что после стерилизации почвы биологическое потребление кислорода увеличилось в 30 раз (с 18 до 630 мг O_2/кг почвы), а численность реципиентных и транконъюгантных микроорганизмов в стерильной почве в большинстве случаев была на 1-3 порядка выше, чем в нестерильной. Таким образом, следствием высокой численности донорного штамма BS394(pNF142::Tn*Mod*-OTc) в микрокосме 4 было ускорение деградации нафталина по сравнению с микрокосмом 5. При этом в микрокосме 5 деструкцию нафталина обеспечивали как штамм BS394(pNF142::TnMod-OTc), так и аборигенные бактерии-деструкторы. Образующиеся трансконъюганты KT2442(pNF142::TnMod-OTc) в микрокосмах 4 и 5, по всей видимости, не оказали серьезного влияния на процесс деструкции нафталина вследствие их низкой численности в почве.

Катаболические плазмиды, выделенные из аборигенных микроорганизмов-деструкторов нафталина, имели размер около 90 т.п.н. ПЦР-анализ с праймерами, специфичными для гена *nah*Ac большой субъединицы нафталиндиоксигеназы, показал наличие в составе тотальной ДНК генов *nah*Ac как в выделенных аборигенных штаммах, так и трансконъюгантах. Анализ плазмидной ДНК, обработанной эндонуклеазами рестрикции, выявил сходство рестрикционных профилей аборигенных плазмид и меченой плазмиды биодеградации нафталина pNF142::Tn*Mod*-OTc между собой (Рис. 39), а также с известной плазмидой биодеградации нафталина pDTG1 (Dennis and Zylstra, 2004). Данный факт согласуется с литературными данными об обнаружении pDTG1-подобных плазмид в различных географически удаленных регионах. Плазмиды, подобные pDTG1, были описаны американскими учеными (Stuart-Keil et al., 1998), которые выделили их из штаммов, обнаруженных в почве загрязненного каменноугольными смолами сайта Glen Falls (штат Нью-Йорк, США). Деннис и Зялстра (Dennis and Zylstra, 2004) отмечают сходство организации плазмиды pDTG1 и плазмиды биодеградации толуола pWW0 (Greated et al., 2002).

Таким образом, в лабораторных условиях показано, что в почве происходит перенос плазмид биодеградации нафталина, причем возникающие в почве трансконъюганты могут способствовать ускорению процесса микробной деструкции загрязнителя. Топ и Шпрингель (Top and Springael, 2004) называют данное явление синергетическим эффектом совместного удаления загрязнителя, когда распространение генов биодеградации среди членов микробного сообщества приводит к максимально эффективному потреблению поллютанта различными штаммами.

4.3.3 Горизонтальный перенос плазмид биодеградации нафталина в почве в открытой окружающей среде

Недостатки лабораторных экспериментов, такие как плохая культивируемость некоторых микроорганизмов, селективный отбор быстрорастущих бактерий при культивировании в лабораторных условиях, искусственное поддержание заданных стандартных условий эксперимента, дают неполную картину событий переноса генов и плазмид в микробных популяциях в процессе деградации поллютантов. Поэтому необходимы опыты с проведением мониторинга переноса генов и возможной модификации («сборки») катаболических путей в естественных условиях открытой окружающей среды.

Вследствие неконтролируемых аспектов полевых экспериментов прямое слежение за судьбой штаммов и плазмид в полевых условиях крайне затруднено (Hill and Top, 1998). Поэтому процесс горизонтального переноса плазмид биодеградации в нестерильной почве и в условиях открытой среды к настоящему времени изучен недостаточно. Известно всего несколько работ, посвященных этому вопросу (Herrick et al., 1997; Stuart-Keil et al., 1998; Hohnstock et al., 2000; Wilson et al., 2003). В работе Херрика с соавт. (Herrick et al., 1997) не приведено прямых доказательств переноса плазмид биодеградации нафталина, но отмечена высокая идентичность генов *nah*Ac, обнаруженных в различных почвенных штаммах-деструкторах. На основании этого сделано предположение, что в процессе горизонтального переноса плазмид биодеградации нафталина происходило распространение гена *nah*Ac между плазмидами разных размеров и хромосомой бактерий, которое, возможно, было обусловлено транспозонами, содержащими этот ген. Несколько позже (Hohnstock et al., 2000) был показан перенос аборигенной плазмиды биодеградации нафталина pCg1 из почвенных доноров в аборигенные рифампицинустойчивые реципиенты только после повторной интродукции донорного штамма, что могло быть следствием низкой частоты конъюгационного переноса в нестерильной почве.

Одновременного наблюдения за судьбой интродуцированного маркированного штамма-деструктора нафталина и меченой плазмиды в открытой почве другими исследователями не проводилось.

В нашей работе (схема полевого эксперимента приведена на Рис. 35) показано, что маркированные плазмидосодержащие штаммы *P. putida* KT2442(pNF142::Tn*Mod*-OTc) и BS394(pNF142::Tn*Mod*-OTc) способны сосуществовать с аборигенными почвенными микроорганизмами и выживать в открытой почве. Однако, численность данных штаммов (Рис. 45) к концу эксперимента значительно снизилась, что, по-видимому, было обусловлено снижением среднесуточной температуры в течение сентября-ноября 2002 г. (Рис. 46). Другие исследователи также отмечали снижение численности интродуцированных в почву бактерий в ходе экспериментов, объясняя данный факт адаптацией вносимых бактерий к неблагоприятным условиям почвы (DiGiovanni et al., 1996; Neilson et al., 1994; Top et al., 1998). В нашей работе показано, что маркированный плазмидосодержащий штамм *P. putida* KT2442(pNF142::Tn*Mod*-OTc) способен выживать в модельной почве (на 40 сутки его численность составляла 1×10^3 клеток на грамм почвы).

Суммарная активность аборигенных деструкторов и интродуцированных штаммов KT2442(pNF142::Tn*Mod*-OTc) и BS394(pNF142::Tn*Mod*-OTc), обеспечила ускоренную деструкцию нафталина на участках 4 и 6 (Рис. 36). Наиболее быстрая убыль нафталина на участке 6 объясняется, по всей видимости, высокой численностью (10^5-10^6 КОЕ/г сухой почвы) штамма BS394(pNF142::TnMod-OTc). Кроме того, на участках 4 и 6 образующиеся трансконъюганты могли внести некоторый вклад в процесс деградации нафталина, оценить количественно который оказалось невозможным.

В нашем эксперименте в открытой почве из пяти возможных путей переноса было обнаружено три (Рис. 47). Частота переноса плазмид составила 10^{-7} - 10^{-6} на клетку донора, что коррелирует с данными, полученными ранее для плазмиды pCg21 в условиях открытой окружающей среды (Hohnstock et al., 2000). Частота плазмидного переноса была выше на участках 4 и 6, содержащих нафталин в качестве селективного фактора. Ранее рядом авторов (Fulthorpe and Wyndham, 1991; Nüβlein et al., 1992; Top et al., 1998; De Lipthay et al., 2001) обнаружено, что селективное давление в почве может значительно влиять на распространение катаболических генов. Однако, в нашей работе перенос меченых плазмид происходил между BS394(pNF142::Tn*Mod*-OTc) и аборигенными бактериями (как флюоресцирующими, так и нефлюоресцирующими) на участке 5 и без селективного давления. Выделенные

трансконъюгантные штаммы относились к роду *Pseudomonas*, что подтверждает литературные данные. Ранее было показано, что перенос генов и плазмид биодеградации нафталина и фенантрена наблюдали главным образом между псевдомонадами (Stuart-Keil et al., 1998; Wilson et al., 2003). В нашей работе в ряде трансконъюгантов (*P. frederiksbergensis* OSP3 и *Pseudomonas* sp. OSP10) плазмидная ДНК подверглась перестройкам (Рис. 48), что может свидетельствовать о присутствии в плазмиде pNF142::Tn*Mod*-OTc транспозонов. Ранее показано наличие транспозонов в составе катаболических плазмид – для плазмиды биодеградации толуола pWW0 (Greated et al., 2004) и плазмид биодеградации нафталина pDTG1 (Dennis and Zylstra, 1998), NAH7 (Tsuda and Iino, 1990), NPL-1 (Соколов и др., 2005).

Полученные результаты подтверждают, что плазмиды биодеградации нафталина переносятся в почвенных микробных популяциях в открытой окружающей среде. Интродукция в открытую почву маркированного плазмидосодержащего *P. putida* KT2442(pNF142::Tn*Mod*-OTc) позволила изучить его выживаемость и конкурентоспособность по отношению к аборигенным микроорганизмам при селективном давлении нафталина и без него и горизонтальный перенос плазмид биодеградации нафталина в аборигенные почвенные микроорганизмы с последующим определением круга хозяев данной плазмиды (представители рода *Pseudomonas*, таксономически близкие с *P. lini, P. frederiksbergensis, P. jesseni, P. graminis, P. putida и P. alcaligenes*).

Процесс переноса плазмидной ДНК является естественным для микробных популяций и может приводить к возникновению новых сочетаний «бактерия-плазмида», иногда более эффективно утилизирующих ксенобиотики. Таким образом, деградативный потенциал почвенных микроорганизмов может быть увеличен не только за счет интродукции бактерий-деструкторов, но и за счет процессов горизонтального переноса плазмид биодеградации.

Полевые исследования микробной деструкции различных загрязнителей должны проводиться с оценкой переноса генов как одного из механизмов локальной адаптации бактериальных популяций к ксенобиотикам. Для оценки вклада горизонтального переноса в адаптацию микробного сообщества к загрязнению необходимо сравнение деградативного потенциала и наличия катаболических генов внутри бактериального сообщества до и после специфического загрязнения. Одним из показателей обмена генами в ответ на загрязнение является обнаружение какого-либо катаболического гена только в одной популяции перед загрязнением, и во множестве филогенетически различных популяций после него. Другим ценным индикатором

является «сборка» в одном организме двух и более различных катаболических генов или оперонов, которые ранее находились отдельно в разных бактериальных штаммах. Пока нет работ с прямым доказательством таких событий, поскольку данные периода до загрязнения обычно недоступны. Несколько полевых экспериментов свидетельствуют о том, что горизонтальный перенос мобильных катаболических генов сыграл важную роль в адаптации микробного сообщества к поллютанту, несмотря на отсутствие данных до загрязнения. Так, после интродукции микроорганизмов, содержащих *phe*BA-оперон (кодирующий ферменты деградации фенола) с целью биоремедиации загрязнения после случайного пожара в Эстонской нефтесланцевой шахте, оперон *phe*BA был обнаружен в нескольких изолятах *Pseudomonas* sp. Эти находки свидетельствуют о том, что несколько бактериальных популяций адаптировались к загрязненной среде путем получения и экспрессии интродуцированного генетического материала, который позволил им использовать поллютант как субстрат (Peters et al., 1997). Ван дер Меер с соавт. (van der Meer et al., 1998) обнаружили, что бактериальная адаптация к загрязнению, как показано усиленным удалением хлорбензола, произошла вследствие генетической рекомбинации среди бактерий в водоносном горизонте, дав в итоге новый путь деградации хлорбензола.

По всей видимости, возникновению катаболических оперонов способствуют мобильные генетические элементы (МГЭ), которые собирают различные катаболические гены вместе в одном хозяине. Явная корреляция между наблюдаемым переносом катаболических генов и адаптацией к специфическим органическим ксенобиотикам отмечается редко, поэтому необходимо изучение роли связанных с переносом факторов. К ним можно отнести условия окружающей среды, которые стимулируют конъюгацию и другие механизмы генного переноса, взаимодействие микроорганизмов внутри сообществ микробиотопов почвы и воды, физиологию и таксис, ответ сообщества как целого, так и отдельных штаммов на загрязнение, существование и перенос аборигенных МГЭ в биотопе, скорость мутаций.

Относительно высокая эффективность горизонтального переноса генов и последующей быстрой «сборки» катаболических путей в окружающей среде вызывает следующие вопросы: как, когда, где, с какой частотой и между какими видами эти события происходят. Интересна интенсивность отбора катаболических генов в природе, условия, необходимые для существования тех или иных МГЭ. Могут ли они поддерживаться в популяции без селективного пресса и как долго? Какие существуют таксономические барьеры для распространения МГЭ и как возникают

предшественники катаболических генов? Неясно, как катаболические гены «захватываются» МГЭ, каким образом различные гены, составляющие полный путь деградации, попадают в один штамм и тем более одну плазмиду. Показано, что частота горизонтального переноса генов повышается в биопленках (Hausner et al., 1999). Биопленки, как и другие биотопы, ризосфера и ресидьюсфера, могут играть еще недооцененную роль в адаптации микробиоты к поллютантам и могут способствовать «сборке» новых катаболических путей посредством горизонтального переноса генов. Дальнейшее исследование генетической организации микроорганизмов, обладающих различными катаболическими МГЭ, их поведения в загрязненных местообитаниях в макро- и микромасштабе позволит более полно понять эволюционные процессы во время адаптации микробных сообществ к загрязнениям.

Селективное давление в местах загрязнения ПАУ способствует горизонтальному переносу катаболических плазмид, а длительность загрязнения повышает вероятность возникновения эффективных комбинаций «штамм-плазмида». В нашей работе показано, что перенос аборигенных катаболических плазмид из почвенных бактерий в подходящий реципиентный штамм в лабораторных условиях способствует ускорению процессов очистки почвы от ПАУ. Перенос плазмид в обратном направлении, из интродуцированного штамма-донора в аборигенные бактериальные реципиенты, также повышает эффективность биоремедиации загрязненных ПАУ почв. На основании наших данных представляется целесообразным при создании биопрепаратов для очистки почв, загрязненных нефтью и ПАУ, использовать в их составе бактерии, содержащие конъюгативные катаболические плазмиды.

4.4 Особенности образования биологических ПАВ, продуцируемых бактериями-эффективными нефтедестукторами

4.4.1 Способность микроорганизмов-нефтедеструкторов к продуцированию биоПАВ

Характерным свойством углеводородокисляющих микроорганизмов является образование поверхностно-активных соединений. БиоПАВ (биосурфактаны, биоэмульгаторы) играют важную роль в процессе микробного окисления водонерастворимых соединений, как алканы, циклоалканы, ПАУ. Биосурфактанты повышают биодоступность субстратов, что делает актуальным изучение строения,

свойств и закономерностей образования этих соединений (Van Hamme et al., 2003; Cameotra and Singh, 2009). Поэтому способность к продукции биоПАВ является одним из основных критериев при выборе наиболее перспективных нефтедеструкторов для составления ассоциаций микроорганизмов-нефтедеструкторов как основы биопрепаратов для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений.

Механизм действия биоПАВ при деградации микроорганизмами углеводородов, связывают с их способностью эмульгировать субстрат, вследствие чего увеличивается площадь контакта клетки с нерастворимым соединением (Beal et al., 2000). Кроме того, биоПАВ могут участвовать непосредственно в активном транспорте алканов через клеточную стенку путём пиноцитоза (Cameotra, Singh 2009). Некоторые биоПАВ, такие как трегаломиколаты родококков, связываясь с клеточной стенкой, увеличивают её гидрофобность. Это обеспечивает непосредственный контакт микробных клеток с гидрофобным субстратом, позволяя им закрепляться на поверхности капли нефти или даже проникать внутрь её (Bouchez-Naitali et al., 1999). Таким образом, для эффективного роста микроорганизмов на гидрофобных субстратах необходимо наличие в среде культивирования биоПАВ.

Биологическая роль биосуфактантов не ограничивается их участием в потреблении гидрофобных субстратов микроорганизмами. Образование биоПАВ можно рассматривать как механизм повышения конкурентоспособности и выживаемости микроорганизмов-продуцентов за счет антибиотических свойств этих соединений. Так, рамнолипиды ингибируют рост различных бактерий и грибов, в том числе, патогенных для человека (Itoh et al. 1971; Vatsa et al. 2010). Грамицидины и полимиксины, продуцируемые бациллами, широко применяются в качестве антибиотиков (Kvitko et al., 2001; Mogi et al., 2000). Кориномиколаты трегалозы относятся к факторам патогенности туберкулёзных микобактерий (Sakaguchi et al., 2000). Также известно, что рамнолипиды псевдомонад участвуют в образовании биоплёнок, но их роль в этом процессе до конца не выяснена (Davey et al., 2003).

Всё вышесказанное свидетельствует о большом потенциале и необходимости тщательного исследования как самих биоПАВ, так и их продуцентов. В настоящее время способность микроорганизмов к образованию биосурфактантов интенсивно изучается и уже находит применение в технологиях биоремедиации почв и грунтов, загрязнённых нефтью и нефтепродуктами (Banat et al., 2010; Christofi and Ivshina, 2002; Salihu et al. 2009; Harvey et al., 1990).

В нашей работе 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.

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

Известно, что источник углерода может оказывать значительное влияние на образование биоПАВ микроорганизмами. При этом, важную роль играет гидрофобность субстрата: рост на водорастворимых и гидрофобных субстратах может принципиально различаться (Muthusamy et al., 2008). Поэтому мы выращивали микроорганизмы на двух распространённых субстратах, относящимся к разным типам: гексадекан, как гидрофобный субстрат, и глюкоза, как гидрофильный.

БиоПАВ, продуцируемые микроорганизмами, могут быть двух типов: внеклеточные (экзо-тип) и клеточносвязанные (эндо-тип). Полученные данные (Табл. 24) 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 наблюдалось значительное снижение поверхностного натяжения: до 34–31 мН/м (в контроле 77 мН/м), отмечены наибольшие значения эмульгирующей активности (для штамма *Rhodococcus* sp. S26) и индексов эмульгирования (для штаммов *Rhodococcus* sp. S67 и *Rhodococcus* sp. X5). Анализируя эти характеристики, можно заключить, что родококки более эффективные продуценты биосурфактантов при росте на гидрофобном источнике углерода и энергии, чем псевдомонады.

После выращивания на глюкозе в бесклеточном супернатанте родококков наблюдалась низкая оптическая плотность и отсутствие плотного эмульсионного слоя, а в культуральной жидкости значения индексов эмульгирования были высоки, что могло свидетельствовать об образовании родококками биоПАВ, ассоциированных с клеточной стенкой (эндо-тип), при росте на глюкозе. Изучение эмульгирующих свойств целых клеток микроорганизмов, выращенных на гидрофильных субстратах (Табл. 25), показало, что клеточные суспензии родококков способны эффективно стабилизировать эмульсии гексадекана с водой: индексы эмульгирования E_{24} составили 35–48%, а для клеток псевдомонад (*P. fluorescens* 142NF и *P. putida* BS3701) эмульгирования не наблюдалось ($E_{24} = 0$).

Таким образом, все исследованные микроорганизмы-нефтедеструкторы родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas* способны синтезировать биоПАВ. Наиболее эффективными продуцентами биосурфактантов экзо-типа являются родококки при росте на гексадекане, а при росте на глюкозе они образуют клеточносвязанные биоПАВ (эндо-тип). Псевдомонады продуцируют только внеклеточные биосурфактанты.

4.4.2 Определение особенностей строения биосурфактантов

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

Полученные образцы биоПАВ исследовали с помощью масс-спектрометрии электронного распыления в режиме положительной ионизации. Для гликолипидов микроорганизмов *P. fluorescens* 142NF, *P. putida* BS3701 ряд сигналов наблюдается в диапазоне 700–900 Да (рис. 94). Одним из наиболее интенсивных является пик, который соответствует псевдомолекулярному иону [M+H+] массой 803 Да. Известно, что массой 802 Да обладает рамнолипид В, содержащий два остатка гидрокидекановой кислоты и один остаток деценовой кислоты (рис. 94а) (Abdel-Mawgoud et al., 2010). Разница в массах для каждой пары соседних пиков составляет 14 Да, что соответствует массе фрагмента (–CH_2–). Для псевдомонад характерно образование рамнолипидов, содержащих гомологичные жирные кислоты. Анализируя полученные данные, можно предположить, что микроорганизмы штаммов *P. fluorescens* 142NF и *P. putida* BS3701 образуют смесь рамнолипидов, гомологичных рамнолипиду типа В.

В масс-спектре биоПАВ, продуцируемых *Rhodococcus* sp. X5 и *Rhodococcus* sp. S26, присутствуют одинаковые пики (Рис. 94б). В ряде исследований при изучении биоПАВ родококков основные сигналы в масс-спектрах электронного спрея были представлены псевдомолекулярными ионами [M+Na+] массами 871.5 и 899.6 Да (Rapp and Gabriel-Jurgens , 2003; Tuleva et al., 2008). Было установлено, что им соответствуют гомологичные сукциноилтрегалолипиды: диоктаноил-деканоил (848 Да) и октаноил-дидеканоил (876 Да), различающиеся на 28 Да, то есть на удвоенный метиленовый фрагмент (–CH2–)2 (Рис. 94б). Сравнение этих результатов с полученными в нашей работе, позволяет заключить, что изучаемые бактерии *Rhodococcus* sp. X5 и *Rhodococcus* sp. S26 продуцируют трегалолипиды аналогичного строения. Остальные три сигнала не удалось сопоставить с определёнными структурами. Можно отметить, что разница между двумя пиками 866.4 и 894.4 также равна 24 Да, что может свидетельствовать о наличии гомологичных соединений.

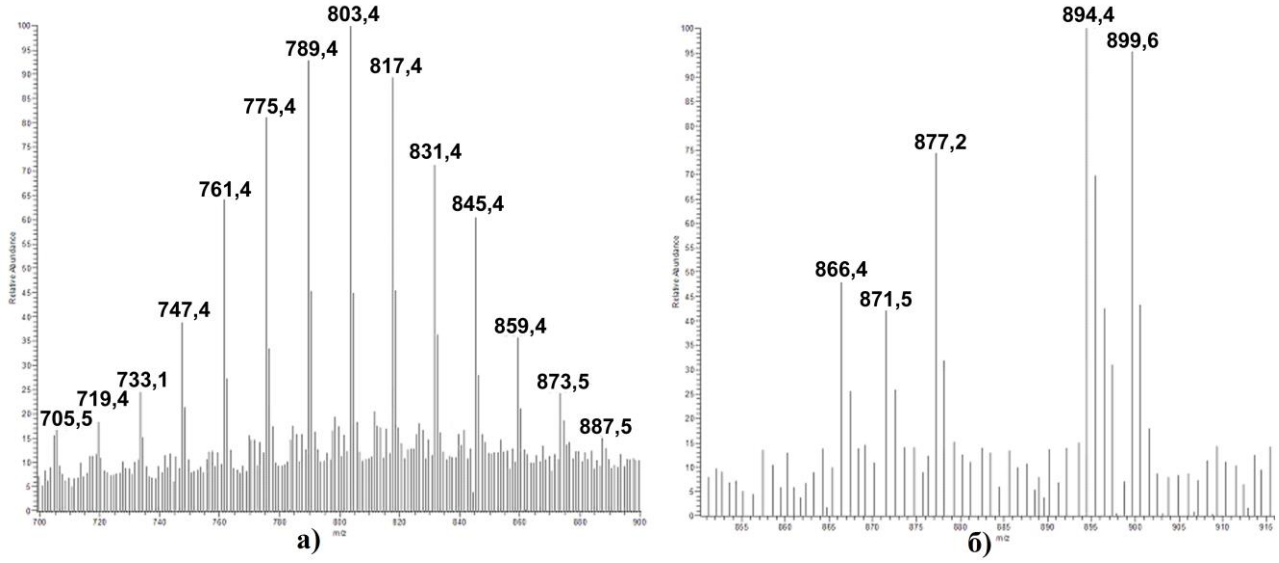


Рис. 94 Масс-спектры гликолипидных биоПАВ, продуцируемых штаммами:
а) P. fluorescens 142NF;
б) Rhodococcus sp. X5.

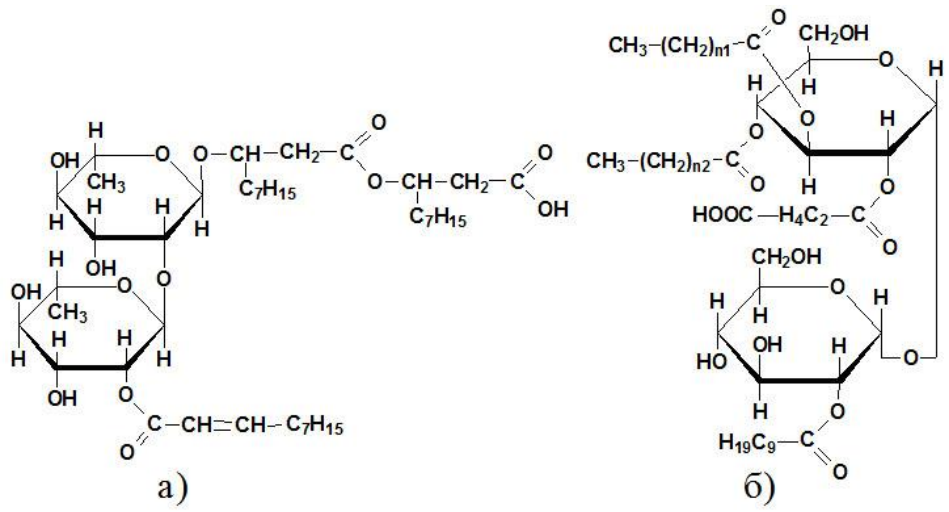


Рис. 95 Предполагаемая структура гликолипидных биоПАВ
а) Рамнолипид В, продуцируемый бактериями рода Pseudomonas (Abdel-Mawgoud et al., 2010);
б) Сукциноил-трегалолипиды, продуцируемые бактериями рода Rhodococcus (n1, n2 = 6, 8) (Rapp and Gabriel-Jurgens, 2003; Tuleva et al., 2008).

В биоПАВ, выделенных из псевдомонад и из родококков, методом ИК-спектроскопии показано наличие функциональных групп, характерных для предполагаемых структур гликолипидов (Рис. 95).

Таким образом, все исследованные в данном разделе микроорганизмы-нефтедеструкторы *P. fluorescens* 142NF, *P. putrida* BS3701, *Rhodococcus* sp. S67, *Rhodococcus* sp. X5, *Rhodococcus* sp. S26 продуцируют гликолипидные биоПАВ. Преобладающим среди гомологичных дирамнолипидов псевдомонад (*P. fluorescens* 142NF и *P. putrida* 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.

4.5 Составление и отбор ассоциаций микроорганизмов, перспективных для использования в составе биопрепаратов

Несмотря на огромный экспериментальный материал и множество работ, посвященных проблемам микробного окисления углеводородов нефти и биоремедиации нефтезагрязненных территорий и акваторий, в настоящее время не

разработано общепринятой методологии конструирования биопрепаратов и не существует универсального биопрепарата для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений.

Это обусловлено следующими объективными причинами: во-первых, как неоднократно отмечалось, нефть состоит из нескольких сот соединений, причём нефти разных месторождений отличаются друг от друга по фракционному и композиционному составу; во-вторых, в практике биоремедиации приходится сталкиваться не только с нефтяными загрязнениями, но и с загрязнениями нефтепродуктами, которые резко отличаются по химическим свойствам от сырой нефти; в-третьих, районы добычи, переработки и хранения нефти и нефтепродуктов, в которых требуются биоремедиационные мероприятия, значительно отличаются друг от друга по природно-климатическим и гидротермическим условиям.

Тем не менее, применение биопрепаратов на основе активных нефтедеградирующих микроорганизмов является совершенно оправданным и необходимым способом ускорения очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений, а иногда и единственной альтернативой, в случаях, когда нефтеокисляющая активность аборигенных микроорганизмов очень мала или полностью отсутствует, что часто имеет место в регионах с холодным климатом.

Поскольку нефть является многокомпонентной субстанцией, ни один из микроорганизмов не способен деградировать все компоненты нефти, поэтому для более полной их утилизации используют различные ассоциации микроорганизмов, способных утилизировать различные фракции нефти.

4.5.1 Составление и отбор ассоциаций микроорганизмов, способных к деградации углеводородов нефти при пониженной температуре

Для составления ассоциации штаммов-деструкторов углеводородов нефти были использованы два подхода:

1) объединение микроорганизмов в ассоциации на основании анализа их физиологических, метаболических и деструктивных свойств, а также наличия плазмид;

2) селекция при периодическом культивировании смешанного консорциума наиболее активных микроорганизмов 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: *Rhodococcus* sp. X25, *Rhodococcus*

sp. X5, *Rhodococcus* sp. S25, *Rhodococcus* sp. S26, *Rhodococcus* sp. S67, *Pseudomonas fluorescens* 142NF(pNF142), *Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142), *Microbacterium* sp. Ars25 и *Rhodococcus equi* Ars38.

Первый подход к созданию ассоциации активных микроорганизмов-деструкторов был основан на анализе физиологических и метаболических характеристик исследованных штаммов-деструкторов (Табл. 9-14, Рис. 15) . Нами было показано, что штамм *Rhodococcus* sp. X5 наиболее эффективен в качестве деструктора моно- и полиароматических углеводородов. Штаммы *Pseudomonas fluorescens* 142NF(pNF142) и *Rhodococcus* sp. S25 разлагают асфальтено-смолистые компоненты нефти, кроме того, *Pseudomonas fluorescens* 142NF(pNF142) достаточно эффективно утилизирует полициклические ароматические углеводороды, а *Rhodococcus* sp. S25 способен к деградации алифатических углеводородов. *Rhodococcus* sp. X5 способен к росту в жидкой минеральной среде в присутствии повышенной концентрации NaCl (7 и 10%). Штамм *Rhodococcus* sp. S67 обладает высокой эмульгирующей активностью по сравнению с другими микроорганизмами, кроме того, обладает наибольшей деструктивной активностью по отношению к нефти при 4ºС (47%). Таким образом, был предложен следующий вариант ассоциации, состоящей из четырёх штаммов: *Rhodococcus* sp. S25, *Rhodococcus* sp. X5, *Rhodococcus* sp. S67 и *Pseudomonas fluorescens* 142NF(pNF142).

Для селекции микроорганизмов с помощью второго подхода девять выбранных штаммов культивировали в жидкой минеральной среде с нефтью. В результате проведённых экспериментов была отселектирована ассоциация микроорганизмов, состоящая из *Rhodococcus* sp. X5, *Rhodococcus* sp. S67, *Pseudomonas fluorescens* 142NF(pNF142), *Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142). После 10 суток культивирования при 24°С 57% от общей популяции микроорганизмов составляли псевдомонады, а при 4°С — 90% от общей популяции. При 24°С 80% общей популяции родококков было представлено штаммами *Rhodococcus* sp. S67 и *Rhodococcus* sp.X5, а при 4°С эти же два штамма составляли 70% общей популяции родококков.

Таким образом, с помощью двух различных подходов составлены микробные ассоциации, состоящие каждая из четырёх штаммов-деструкторов. Причём три из четырёх микроорганизмов, входящих в состав каждой из ассоциации, являются одинаковыми: *Rhodococcus* sp. X5, *Rhodococcus* sp. S67, *Pseudomonas fluorescens* 142NF(pNF142). Различие заключалось лишь в том, что в состав ассоциации,

полученной путём селекции, входил *Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142), а в состав другой ассоциации – *Rhodococcus* sp. S25.

Для выбора из этих двух ассоциаций более эффективной, было проведено сравнение степени деструкции нефти. Показано, что ассоциация, отобранная в процессе селекции микроорганизмов, более эффективно утилизирует углеводороды нефти: 11.4% против 7.8% за 10 суток при температуре 4°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 в широком температурном диапазоне (от 4 до 32°C), что позволяет использовать их при биоремедиации нефтезагрязнённых территорий в различных регионах России; во-вторых, деградация нефти и нефтепродуктов в присутствии 3–5% NaCl; в-третьих, при культивировании в минеральных средах с использованием в качестве источника углерода и энергии нефтепродуктов микроорганизмы синтезируют биоэмульгаторы и обладают высокой эмульгирующей активностью; в-четвёртых, бактерии рода *Pseudomonas* несут в своём составе конъюгативные катаболические плазмиды биодеградации ПАУ, наличие же таких плазмид, способствует увеличению деградативного потенциала за счет распространения катаболических генов среди аборигенных микроорганизмов.

Ранее было показано, что более эффективная (по сравнению с мезофильными условиями) биодеградация толуола, октана и дизельного топлива при температуре 4-8°C может быть достигнута только через 28-45 суток (Whyte et al., 1997, 1998). По данным Делилля с соавт. (Delille et al., 2004), процесс очистки субантарктической почвы от загрязнения дизельным топливом и нефтью может протекать в течение нескольких лет. Так, в работе этих авторов отмечено, что деградация даже отдельных фракций нефти после 42 суток составляла 47% и 25% для алканов и полиароматических углеводородов, соответственно.

Известно, что живые существа, включая микроорганизмы, используют различные способы, обеспечивающие возможность обитать совместно с другими видами и занимать определённое место в биоценозе. В работе Головлёва (Головлёв, 2001) описаны r- и K-стратегии выживания видов. Виды r-стратегов, к которым относятся псевдомонады, имеют низкую конкурентоспособность, но быстро захватывают освободившуюся территорию за счёт ускоренного развития, быстро

изменяющегося размера популяции. К-стратеги, к которым принадлежат родококки, более конкурентоспособны и долго удерживают занятую экологическую нишу благодаря более растянутому во времени размножению, меньшей доли ресурсов, затрачиваемых на рост, и невысокой смертности. Предложенная нами ассоциация бактерий как основа биопрепарата «МикроБак» имеет в своём составе представителей обеих стратегий: как родококков, так и псевдомонад.

Следует отметить, что микробная ассоциация «МикроБак» активно деградирует углеводороды нефти при пониженной температуре (4°С), однако, она недостаточно эффективна при высоких концентрациях (более 15%) нефти и при содержании более 5% соли в среде, её диапазон pH 5 – 7.

4.5.2 Составление ассоциации штаммов, способных к деградации высоких концентраций нефти в широком температурном и pH диапазонах

Для биоремедиации водных и почвенных экосистем, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, используются биопрепараты, которые содержат жизнеспособные клетки как отдельных штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов («Путидойл», «Олеворин») (Жолобов с соавт., 1995; Щеблыкин с соавт., 1995), так и бактериальные консорциумы, например, «Деворойл» (Борзенков и др., 1994), «Биодеструктор» (Мурзаков и др.,1993), «Нафтокс» (Белонин и др.,1996), «Родер» (Мурыгина и др.,1999). В связи с тем, что в состав нефти входит большое количество различных химических соединений и ни один штамм микроорганизмов не обладает всем спектром ферментов, необходимых для биодеградации этих компонентов, представляется необходимым применение ассоциаций штаммов для наиболее полной и эффективной деструкции углеводородов нефти. Внесение нескольких штаммов в загрязненный субстрат, отличающихся по спектру потребляемых веществ, позволяет утилизировать нефть более эффективно (Кобзев и др., 2001). В условиях природного микробиоценоза происходит одновременная ассимиляция разных фракций нефти различными группами микроорганизмов (Шкидченко, Аринбасаров, 2001). Таким образом, применение ассоциации штаммов-деструкторов позволяет осуществлять деградацию нефти более полно (Сидоров, 1996; Грищенков и др., 1997; Boronin et al., 1997). Однако общепринятых критериев составления ассоциаций штаммов-нефтедеструкторов до настоящего времени не выработано, и в состав биопрепаратов включают штаммы по принципу их совместимости и высокой нефтеразлагающей активности. Основными недостатками существующих биопрепаратов являются: узкий рабочий диапазон pH и температур; неспособность микроорганизмов, входящих в

состав биопрепаратов, продуцировать биоэмульгаторы; малая эффективность деградации высоких концентраций нефти и нефтепродуктов; отсутствие данных о катаболических плазмидах в клетках микроорганизмов-нефтедеструкторов; часто бактерии, входящие в биопрепарат, являются представителями одного рода. Как следует из результатов раздела 3.1, присутствие плазмиды ускоряет и расширяет деградативные возможности штамма – хозяина, поэтому представляется целесообразным использование плазмидосодержащих штаммов для составления микробного консорциума для очистки окружающей среды от нефти и нефтепродуктов.

Для разработки эффективной ассоциации микроорганизмов-деструкторов нефти был проведен анализ запатентованных аналогов с целью выявления их недостатков. В результате проведенного патентного поиска были выделены следующие свойства, необходимые для повышения эффективности разрабатываемого консорциума:

- способность к росту на средах с концентрацией нефти и нефтепродуктов более 30% (так как уровень загрязнения в естественных условиях зачастую высок);
- устойчивость к присутствию 3 - 5% соли (хлорид натрия, морская соль) в среде (галотолерантность бактерий необходима при биоремедиации морских побережий и акваторий, а также болот в случае их засоленности и засоленных почвогрунтов в местах нефтедобычи);
- способность к деградации углеводородов нефти в широком диапазоне pH 4-10 (поскольку многие нефтезагрязнения локализованы в кислых и щелочных почвах);
- продуцирование биоПАВ при культивировании в нефтезагрязненных средах (биоэмульгаторы снижают вязкость нефти и повышают ее биодоступность);
- содержание катаболических плазмид в бактериальных клетках, что способствует расширению спектра утилизируемых субстратов клетки-хозяина за счет присутствия генов, кодирующих ключевые ферменты деградации различных углеводородов нефти.

Вышеперечисленными свойствами не обладает ни один из запатентованных биопрепаратов или консорциумов микроорганизмов-нефтедеструкторов.

Критерии отбора и штаммы, использованные нашей работе, приведены в Табл. 52.

Таблица 52. Критерии отбора микроорганизмов и штаммы, использованные для составления ассоциации «ВиО».

критерии отбора микроорганизмов	**микроорганизмы**
pH среды 4 – 10	1A, **1B**, **2A**, 2B, **6**, **7**, S25, S26 и F701
5% NaCl	1A, 1B, 2A, **2B**, 2C, 3, 4, 5, 6, 7, **X5**, X25, S25, S26, S67, **142NF** и F701
температура 2 – 42°C	1B, 6, 7, S25, S26 и F701
концентрация нефти 30% при 24°C	**1B**, **6**, 7, X25, **S25**, **S26** и **F701**
концентрация нефти 20% при 2 – 4°C	**6**, **7**, S25, **S26** и F701
концентрация дизельного топлива 30% при 24°C	**1B**, **2C**, **6**, 7, **S26** и **F701**
концентрация дизельного топлива 30% при 2 – 4°C	**1B**, 6, 7, **S26** и F701
активный продуцент биосурфактантов	1B, 7, X5, S26, S67 и F701
наличие катаболических плазмид	1B, 4, 6, 7, S26, S67, X25, S25 и F701

Примечание: жирным шрифтом выделены штаммы с наилучшими показателями критериев отбора

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

Далее выбранные 6 штаммов были инокулированы в жидкую минеральную среду при pH среды 4, загрязненную 15% нефти при температурах 4°C или 24°C. Бактерии *Rhodococcus erythropolis* S26, *Acinetobacter baumannii* 1B, *Acinetobacter baumannii* 7 и *Pseudomonas putida* F701 количественно доминировали в смешанной популяции через 10 суток культивирования. В результате, перечисленные микроорганизмы вошли в состав ассоциации, которая получила название консорциум «ВиО».

Следует отметить, что бактерии *Acinetobacter baumannii* 1B, *Rhodococcus erythropolis* S26, *Acinetobacter baumannii* 7 с большой вероятностью содержат плазмиды биодеградации гексадекана, а штамм *Pseudomonas putida* F701 имеет гены биодеградации нафталина в составе конъюгативной плазмиды pF701a. Таким образом, отобранная ассоциация плазмидосодержащих штаммов-деструкторов «ВиО» перспективна для очистки почвенных и водных экосистем от загрязнения высокими концентрациями (до 30%) нефтепродуктов в широком температурном (4-42°C) и pH (4-10) диапазонах.

4.6 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 коммерческим биопрепаратом «Биоойл» (ЗАО «Биоойл», г. Новосибирск), состоящим из микроорганизмов родов *Bacillus, Sacharomyces, Acinetobacter, Enterobacter*, в жидкой минеральной среде с нефтью в качестве единственного источника углерода и энергии без добавления морской соли, а также в жидкой минеральной среде с нефтью или дизельным топливом в качестве единственного источника углерода и энергии с добавлением 3% морской соли при температурах 4°С и 24 °С в течение 30 дней.

Полученные данные представлены на Рис. 53-55 и суммированы в Табл. 53.

Таблица 53. Степень деструкции нефти опытными образцами биопрепаратов «МикроБак», «ВиО» и биопрепаратом «Биоойл» в жидкой минеральной среде на 30-е сутки эксперимента (%).

Модельная система	«ВиО»		«МикроБак»		«Биоойл»	
	4°С	24°С	4°С	24°С	4°С	24°С
нефть, 15%	45	39	40	34	36	36
нефть,15% + 3% морской соли	33	21	33	21	18	3
дизельное топливо, 15% + 3% морской соли	64	61	54	37	44	30

Анализ полученных результатов позволяет заключить, что наиболее эффективным во всех модельных системах является препарат «ВиО» как при 4°С так и при 24 °С. По-видимому, это обусловлено метаболическими возможностями штаммов, входящих в состав данной микробной ассоциации, а также наличием плазмид биодеградации нафталина у псевдомонад и гексадекана у родококков (данные раздела 3.1.2).

Потребление нефти и дизельного топлива бактериями, входящими в состав биопрепаратов «МикроБак» и «Биоойл» происходило медленнее, что, возможно, связано с более длинным периодом их адаптации, что подтверждалось данными соответствующих кривых роста.

Присутствие морской соли в модельной системе снижало эффективность деградации нефти приблизительно на 10-15%.

Степень деструкции дизельного топлива всеми биопрепаратами была больше, чем степень деструкции нефти. По-видимому, это связано с тем, что в состав дизельного топлива входят более легкоразлагаемые микроорганизмами углеводороды (van Hamme et al., 2003; Delille et al., 2004; Fuentes et al., 2014), по сравнению с другими компонентами нефти.

В целом можно отметить, что все три биопрепарата более эффективны при низкой температуре. По-видимому, бактерии, входящие в состав биопрепаратов «ВиО», «МикроБак» и «Биоойл» являются уникальными психротрофными деструкторами, более эффективно разлагающими нефть и дизельное топливо при пониженной температуре, чем при 24 ºС. Следует подчеркнуть, что деградация нефти в исследуемых модельных системах (Рис. 60, 62-64 и Табл. 45) приведена с вычетом абиотической убыли (в основном, за счёт испарения) нефти или дизельного топлива, оцененной в контроле при каждой температуре. Причем абиотическая убыль при температуре 4°С была меньше, чем при 24°С. Соответственно, остаточное содержание углеводородов нефти в контроле при низкой положительной температуре было больше, чем при 24°С. Очевидно, в контроле и модельных системах при 4°С, количество летучих биодоступных и легкоусваиваемых бактериями углеводородов превышало содержание этих соединений в системах при температуре 24°С. Несмотря на то, что при комнатной температуре микроорганизмы находились в оптимальных условиях роста, им были доступны в основном средние и тяжелые фракции нефти, требующие более длительного периода окисления. Это возможное объяснение большей степени деструкции углеводородов нефти психротрофными микроорганизмами при низкой (4°С) температуре.

Проведенный патентный поиск не выявил аналогов, способных к эффективной деградации углеводородов нефти при низкой положительной температуре по сравнению с 24 ºС.

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

Оценка эффективности биопрепаратов была проведена в модельных нестерильных почвенных системах, загрязненных 2% нефти (Табл. 37): оценивали вклад аборигенных микроорганизмов в деградацию углеводородов, исследовали степень деструкции нефти и изменение численности интродуцированных и аборигенных микроорганизмов (Рис 65 и 66).

Внесение в почву дополнительных биогенных элементов (источник азота, фосфора и калия) в виде минеральных удобрений – нитроаммофоски, также повышало эффективность деградации нефти: степень деструкции – 31%, в контроле – 23%.

Было установлено, что внесение в почву опытных образцов биопрепаратов «ВиО», «МикроБак» и «Биоойл» вместе с нитроаммофоской резко ускоряет процесс биодеградации нефти по отношению к контрольной нефтезагрязненной почве. По данным Биккининой с соавт. (Биккинина с соавт., 2006), одновременное использование удобрений и биопрепаратов способствует повышению степени деградации загрязнителя и увеличению численности углеводородокисляющих микроорганизмов.

Известно, что легкие фракции обладают наибольшей токсичностью по отношению к живым организмам (van Hamme et al., 2003; Fuentes et al., 2014), но влияние их достаточно кратковременно вследствие быстрого испарения, биодеградации, рассеивания. Тяжелые фракции менее токсичны, но они значительно ухудшают свойства почв, затрудняя водо- и газообмен. Эти компоненты очень устойчивы и могут сохраняться в земле продолжительное время. Наиболее опасна группа ПАУ, являющихся продуктами неполного сгорания ископаемого топлива и органических веществ (Панченко и др., 2003). По данным фракционного анализа (Табл. 19 и 20), микроорганизмы ассоциации «ВиО» способны к деструкции разных фракций нефти, что, возможно, и обеспечило максимальную убыль нефти в данном эксперименте 59% (Табл. 37). Кроме того, возможно, что присутствие катаболических плазмид в штаммах ассоциации «ВиО» также давало преимущество в деградации нефти.

Углеводородокисляющие микроорганизмы, входящие в основу биопрепарата и вносимые в почву, должны обладать высокой жизнеспособностью (Звягинцев и др., 1998). Видимо, это справедливо для всех штаммов ассоциации «ВиО», поскольку их

численность находилась примерно на одном уровне в течение всего эксперимента (микрокосмы 1 и 2) (Рис. 65).

Внесение микроорганизмов-нефтедеструкторов может обеспечивать пополнение экосистемы ферментами микроорганизмов, которые были ингибированы у аборигенной микробной популяции во время разлива нефти, а также в целом увеличивает биологическую активность почв (Алехин и др., 1998). Известно, что загрязнение нефтью обуславливает флуктуацию среды, снижает видовое разнообразие микроорганизмов за счет отбора немногочисленных видов с повышенной метаболической активностью (Исмаилов, 1988). В наших экспериментах наблюдалось увеличение общей численности нефтедеструкторов на 1 порядок и эффективная деградация углеводородов нефти в модельных системах 3-5 (Рис.66 и Табл. 37) за счет физиологической и метаболической активности интродуцированных штаммов-деструкторов.

В целом, проведенные лабораторные испытания продемонстрировали более эффективную утилизацию углеводородов нефти опытным образцом биопрепарата «ВиО» (59%) по сравнению с препаратами «МикроБак» (52%) и «Биоойл» (45%) при одновременном внесении минеральных удобрений.

4.8 Раздельное и совместное культивирование микроорганизмов-нефтедеструкторов

Одним из основных этапов создания биопрепаратов для очистки от нефтяных загрязнений является получение биомассы активных микроорганизмов-нефтедеструкторов. Важнейшей задачей при этом является обеспечение максимально низкой себестоимости готового продукта при максимальном выходе биомассы с сохранением деградативных свойств. В качестве наиболее показательных характеристик, по которым можно оценить эффективность процесса периодического культивирования микроорганизмов, в настоящей работе использовали количество полученной биомассы, численность живых микроорганизмов в биомассе, общую продолжительность культивирования. Кроме того, для проверки сохранения у бактерий способности к окислению углеводородов нефти, проводили высевы на среды, содержащие нефть, дизельное топливо или нафталин в качестве единственного источника углерода и энергии.

Культивирование микроорганизма *P. fluorescens* 142NF проводили с добавлением салицилата натрия (Рис. 67), поскольку известно, что салицилат является

индуктором ферментов деградации полиароматических углеводородов, входящих в состав тяжёлых фракций нефти (Van Hamme et al., 2003; Kurtzman et al., 2010). Следовательно, выращенные в таких условиях микроорганизмы будут обладать способностью к наиболее полной деградации компонентов нефти. В другом случае (Рис. 67) использовали добавку дизельного топлива (ДТ), как одного из наиболее распространённых нефтепродуктов. Микроорганизмы, выращенные в присутствии ДТ, могут быть более адаптированы к росту в условиях загрязнения нефтепродуктами.

Наилучшие результаты были получены при выращивании псевдомонад с салицилатом. За счёт индукции ферментных систем удельная скорость роста после внесения добавки возрастала более чем в два раза. Добавка же ДТ, напротив, привела не только к резкому замедлению роста, но даже к временному снижению численности микроорганизмов, так что рост пришлось поддерживать путём дополнительного внесения легко потребляемого субстрата – глюкозы. Такое влияние ДТ может объясняться наличием в нём примесей, например, короткоцепочечных алканов, оказывающих токсическое воздействие на микроорганизмы (Sikkema et al., 1995).

В работе Дербышева с соавторами (Дербышев и др., 1998) при культивировании микроорганизма *Pseudomonas fluorescens* с кислородным лимитированием в течение 24 часов содержание живых клеток в биомассе не превышало $5{,}0\times10^{10}$ КОЕ/мл. Оптимизация процесса путём дробного внесения питательной среды позволила увеличить численность микроорганизмов до $1{,}2\times10^{11}$ КОЕ/мл, но при этом время культивирования составило 42 часа. В нашей работе при ферментации с индукцией салицилатом численность микроорганизмов $4{,}2\times10^{10}$ КОЕ/мл была достигнута за вдвое меньший срок – 14 часов. При культивировании двух бактерий *P. putida* ПП44 и ПП35 в среде на основе гидролизата соевой муки с добавлением перфторана (Бакулин и др., 2004) к 16 часу роста численность микроорганизмов составляла $3{,}8\times10^{9}$ и $6{,}0\times10^{9}$ КОЕ/мл, соответственно, что ниже достигнутых нами: $6{,}7\times10^{9}$ КОЕ/мл уже к 14 часу роста. Эти результаты свидетельствуют, что в нашей работе сбалансирован химический состав питательных сред и оптимально подобраны условиях культивирования микроорганизмов. Таким образом, внесение салицилата позволило провести процесс всего за 14 часов, обеспечив высокий выход биомассы жизнеспособных микроорганизмов.

Выращивание микроорганизма штамма *Rhodococcus* sp. S67 (Рис. 68) проводили в условиях, сходных с условиями культивирования псевдомонад. Сравнение динамики роста двух данных микроорганизмов в одинаковых условиях позволило оценить возможность и условия их совместного культивирования. Следует отметить высокую

удельную скорость роста бактерий штамма *Rhodococcus* sp. S67 (0,51 $ч^{-1}$), которая позволила эффективно осуществить культивирование за достаточно короткое время. В работе Бакулина и др. (2004) при культивировании бактерий *R. erythropolis* ВУ5 в жидкой питательной среде, содержащей соевую муку и перфторан, через 24 часа максимальная достигнутая численность микроорганизмов составила $5,4\times10^9$ КОЕ/мл, что на порядок ниже, чем в нашей работе ($4,9\times10^{10}$ КОЕ/мл).

В нашей работе показано, что скорость роста псевдомонад значительно превышает скорость роста родококков (рис. 67–68). Рассчитанные нами значения максимальных удельных скоростей роста в экспоненциальной фазе составили 1,9 $ч^{-1}$ (культивирование с салицилатом, 10–12 часы роста) и 0,9 $ч^{-1}$ (культивирование с ДТ, 10–12 ч.), а для родококков – 0,5 $ч^{-1}$ (12–22 ч.). Кроме этого, лаг-фаза у родококков в два раза продолжительнее, чем у псевдомонад, а общее время процесса также в два раза больше, чем для культивирования с салицилатом. Это согласуется с существующими данными, характеризующими родококки как более медленно растущие бактерии по сравнению с псевдомонадами. Следовательно, при выращивании этих двух микроорганизмов в смешанной культуре засев псевдомонад необходимо осуществлять через 10–14 часов роста родококков.

Для снижения себестоимости готового биопрепарата можно использовать совместное культивирование микроорганизмов, входящих в него. В ряде работ (Саксон и др., 1998; Куюкина и Ившина, 2002; Мурыгина и др., 2001) было показано успешное применение смешанных культур для приготовления бактериальных препаратов. Это позволяло решить проблему адаптации культур в микробной ассоциации, а также реализовать экономические преимущества совместного культивирования. Однако, применение данного способа не всегда возможно по ряду причин. Во-первых, многие виды микроорганизмов обладают способностью ингибировать рост других, что является одной из стратегий выживания в специфических экологических нишах, например, за счёт продукции антибиотиков (Современная микробиология, 2005). Во-вторых, условия для оптимального роста бактерий могут значительно различаться.

Как было показано в наших экпериментах, микроорганизмы *P. fluorescens* 142NF и *Rhodococcus* sp. S67 способны к эффективному росту в монокультуре в одинаковых условиях, следовательно, эти же условия можно использовать проведения для совместного культивирования. Кроме того, по данным различных исследований известно, что исследуемые микроорганизмы родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* не только не ингибируют рост друг друга, но даже способны повышать эффективность

окисления нефти при совместном выращивании (van Hamme and Ward 2001). Известны и другие закономерности увеличения степени деградации углеводородов, вызванные наличием процессов соокисления и физиологическими особенностями микроорганизмов. В работе Коронелли с соавт. (1984) при росте смешанной культуры *Pseudomonas aeruginosa* и *Mycobacterium mucosum* наблюдалось увеличение степени деградации углеводородов по сравнению с монокультурами. Следует отметить, что максимальный эффект достигался при внесении культуры псевдомонад после начала культивирования с задержкой по времени. На основе этих данных был сделан вывод о возможности получения биопрепарата, состоящего из бактерий родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*, путём их совместного культивирования.

Поскольку скорость роста псевдомонад выше, чем родококков, то для получения близких численностей микроорганизмов в смешанной культуре необходимо вносить посевной материал быстрорастущей культуры псевдомонад после инокуляции родококков с задержкой по времени, которая в нашей работе составила 12 часов. Кроме того, если не соблюсти условие согласованного роста культур, то для одной из них может начаться фаза отмирания клеток до остановки процесса, что приведёт к значительному снижению качества биопрепарата.

В результате культивирования в выбранных условиях стационарная фаза роста была достигнута одновременно обеими культурами, при этом численности микроорганизмов одного и другого штаммов были близкими (рис. 69). Это свидетельствует об оптимально подобранных времени засева микроорганизмов штамма *P. fluorescens* 142NF, составе среды и режиме культивирования. Отсутствие лаг-фазы у псевдомонад после их внесения подтверждает наличие определённого симбиотического эффекта для этих бактерий (van Hamme and Ward 2001).

Как видно из данных табл. 30, по основным показателям совместная ферментация почти не уступает раздельным, а её преимущества очевидны: число большинства необходимых технологических операций сокращается почти в два раза. Достигнутые численности микроорганизмов *P. fluorescens* 142NF и *Rhodococcus* sp. S67 в полученной клеточной суспензии ($3{,}4\times10^{10}$ КОЕ/мл и $3{,}8\times10^{10}$ КОЕ/мл, соответственно) высоки для жидкой формы биопрепарата. Кроме того, соотношение численностей (примерно 1:1) является оптимальным для наиболее эффективной биоремедиации.

В работе Куюкиной и Ившиной (2002) совместное культивирование *R. erythropolis* ИЭГМ 708 и *R. ruber* ИЭГМ 327, взятых в равном соотношении (посевная доза $3{,}5\times10^{5}$ КОЕ/мл), проводили в ферментере при 28°С в течение 72 часов, что в три

раза больше, чем в нашем исследовании. При культивировании микроорганизмов-деструкторов нефти *P. putida* ПИ Ко-1 и *P. fluorescens* ПИ-896 процесс длился 48 часов (Саксон и др., 1998), что почти в 2 раза больше, чем в нашей работе. Мурыгина и др. (2001) осуществляли выращивание бактерий *R. ruber* ВКМ Ас-1513Д и *R. erythropolis* ВКМ Ас-1514Д в течение 24-28 часов для получения биопрепарата. При этом в каждом указанном примере культуры принадлежали к одному роду, тогда как известно, что препарат, состоящий из микроорганизмов двух различных родов, в частности *Pseudomonas* и *Rhodococcus*, является значительно более эффективным за счёт разных механизмов деградации компонентов нефти и спектров утилизируемых субстратов (van Hamme et al., 2003).

Как показала проверка способности микроорганизмов утилизировать нефтепродукты и отдельные компоненты нефти (гексадекан, нафталин, ДТ), у микроорганизмов обоих штаммов при культивировании не происходит изменений в спектре утилизируемых субстратов (п. 3.8).

Таким образом, в данной работе были подобраны условия культивирования, позволяющие получить биомассу микроорганизмов-нефтедеструкторов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* с высокой численностью живых микроорганизмов, а также с сохранением активности ферментных систем биодеградации углеводородов нефти. Впервые показана возможность совместного культивирования микроорганизмов-нефтедеструкторов *P. fluorescens* 142NF и *Rhodococcus* sp. S67. Выбранный режим ферментации за счёт одновременного достижения культурами стационарной фазы с равным соотношением численности при малой длительности процесса является наиболее выгодным для получения биопрепарата.

4.9 Получение различных форм микробной биомассы и её хранение. Сохранение жизнеспособности и деградативной активности микроорганизмов, входящих в состав биопрепаратов

Хранение биомассы микроорганизмов – не менее важная задача, которую необходимо решить для разработки конечной формы биопрепарата для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений. Однако, большинство публикаций, касающихся вопросов сохранения жизнеспособности микроорганизмов, посвящены лабораторному хранению коллекций или хранению медицинских и пищевых препаратов. Несмотря на наличие общих для всех бактерий закономерностей, таких как влияние температуры хранения, влажности, доступа кислорода, выбор наилучших

условий хранения во многом остаётся нерешённой экспериментальной задачей (Долинов, 1969).

Распространённая форма биопрепаратов – сухая биомасса, обезвоженная с использованием лиофильной (сублимационной) или термовакуумной сушки. При обезвоживании биопрепарата резко возрастают энергетические затраты, поскольку такая сушка – очень энергоемкий процесс. Кроме того, в конечном продукте – сухом порошке выживаемость клеток микроорганизмов обычно составляет 1 – 10% при строгом соблюдении режимов сушки (Miyamoto-Shinohara et al. 2008). При использовании лиофилизации для музейного хранения бактериальных культур такие потери вполне допустимы, так как минимальное содержание жизнеспособных клеток в суспензии, достаточное для восстановления лиофилизированной культуры составляет всего 5×10^2 КОЕ/мл (Нестеров и др., 1986). Но для применения биопрепарата в биоремедиации необходима значительно более высокая численность: порядка 10^7-10^8 КОЕ/г. Высушивание биомассы в этом случае означает, что при резком увеличении себестоимости получается продукт худшего качества. Таким образом, при использовании вместо живой культуры сухого порошка для получения требуемого эффекта необходимо тратить большее количество более дорого препарата.

С этой точки зрения, жидкая культура микроорганизмов более предпочтительна для использования в технологиях биоремедиации, так как обладает более высокой численностью (в 1 г концентрированной суспензии нативной биомассы – до 10^{11} живых клеток, тогда как в сухом препарате, в среднем, на 1-2 порядка ниже), не требует подготовки и существенно дешевле. Однако, в жидкой форме основная масса биопрепарата приходится на воду (до 80%), а недостатком является очень малое время сохранения высокой численности живых клеток.

Таким образом, основными недостатками двух различных форм микробной биомассы, по мнению Долинова (Долинов, 1969), являются:

– для сухой формы препарата – низкая выживаемость микроорганизмов, препарат является достаточно дорогим в пересчете на клетку живого микроорганизма;

– для жидкой формы препарата – невозможность длительного хранения и сложности при транспортировке.

Применение различных веществ может значительно повысить жизнеспособность микроорганизмов при различных условиях хранения. Для жидкой формы используют консерванты, обеспечивающие сохранение бактерий в течение длительного времени. Составы, называемые защитными средами и криопротекторами,

используют для снижения повреждающего действия обезвоживания и замораживания при лиофилизации.

Известно, что пониженная температура обеспечивает лучшее сохранение жизнеспособности микроорганизмов, в то время, как при комнатной температуре гибель клеток значительно ускоряется. Например, в работе Куюкиной и Ившиной (2002) показано изменение численности микроорганизмов *R. erythropolis* ИЭГМ 708 и *R. ruber* ИЭГМ 327 в зависимости от температуры хранения жидких культур (5, 10, 15 и 20ºС). Наибольшая выживаемость микроорганизмов наблюдалась при 5ºС, составив порядка 80% через 10 дней, а при 20ºС – только 10%. При хранении биомассы микроорганизмов *P. fluorescens* при 22°С выживаемость клеток через трое суток составила всего 7% (Дербышев с соавт., 1998). Поэтому в нашей работе осуществляли хранение биомассы в жидкой форме при температуре 2-4°С. Микроорганизмы, полученные при культивировании с салицилатом в фазе замедления роста, хранили в разбавленном фосфатным буфером виде и с 20% раствором сахарозы. Биомассу, выращенную с дизельным топливом до стационарной фазы роста, хранили с 0,2% раствором бензоата и 0,2% раствором глутамата натрия. Для обеих проб оставляли контроль – нативную биомассу. Численность микроорганизмов проверяли через 7, 14, 30 и 60 дней.

В результате изучения динамики численности микроорганизмов было показано, что 0,2% раствор бензоата натрия обладает наилучшим консервирующим эффектом (рис. 96-97), проявляющемся в сохранении жизнеспособных организмов. Через два месяца хранения в варианте с использованием бензоата была показана максимальная выживаемость среди всех исследованных вариантов как для псевдомонад, так и для родококков: 0,17% и 3,0%, соответственно. Известно, что механизм действия бензоата как консерванта основан на ингибировании фосфофруктокиназы при проникновении внутрь микробной клетки (Krebs et al., 1983). По-видимому, такое замедление жизнедеятельности клетки способствует её наилучшему сохранению.

При хранении микроорганизмов с глутаматом натрия получены высокие значения выживаемости бактерий через два месяца, совпадающие с вариантами с бензоатом: 0,15% для псевдомонад и 2,8% для родококков. Поскольку первоначальное действие глутамата на псевдомонады не оказывает защитного эффекта: численность микроорганизмов с этим консервантом через две недели была ниже, чем в контроле (24% и 39%, соответственно), можно предположить, что механизм его защитного действия отличен от действия бензоата. Но за два месяца разница в действии двух исследованных консервантов нивелируется, что, скорее всего, происходит за счёт

общего снижения численности микроорганизмов. На родококки глутамат оказывал консервирующий эффект с первой же недели: выживаемость бактерий совпадала с вариантом с бензоатом в течение всего срока хранения.

Хранение микроорганизмов с использованием сахарозы было наименее эффективным: отмечено значительное снижение численности микроорганизмов обоих изученных штаммов по сравнению с контролем (табл. 39-41). Консервирующее действие концентрированных растворов сахарозы основано на снижении скорости обмена веществ в клетке при её обезвоживании за счёт повышения осмотического давления среды. Но для изученных микроорганизмов, очевидно, такой способ консервирования приводит не просто к остановке жизнедеятельности, но и к гибели клеток, поэтому его использование нерационально.

Из полученных данных видно (табл. 39-41), что нативная биомасса микроорганизмов штамма *P. fluorescens* 142NF, полученная в стационарной фазе роста, хранится лучше, чем полученная в фазе замедления: через две недели численность микроорганизмов в ней выше в три раза, а через два месяца – уже на порядок. Это можно объяснить тем, что в стационарной фазе скорость роста бактерий снижается до нуля и процессы метаболизма в клетках замедляются, за счёт чего и происходит частичная консервация культуры микроорганизмов (Современная микробиология, 2005).

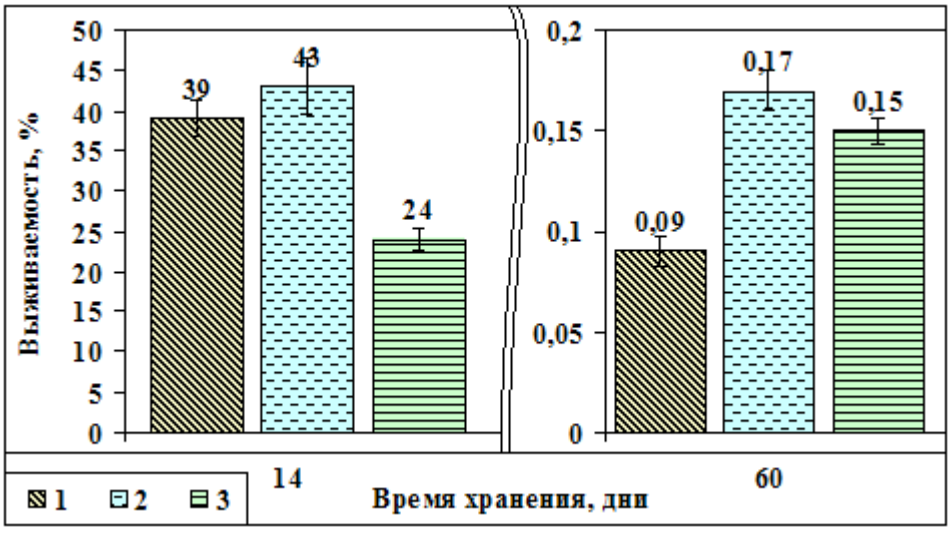


Рис. 96 Сравнение выживаемости микроорганизмов штамма P. fluorescens 142NF при хранении в жидкой форме: 1 – контроль (биомасса полученная в стационарной фазе); 2 – биомасса с бензоатом натрия, полученная в стационарной фазе; 3 – биомасса с глутаматом натрия, полученная в стационарной фазе.

В нашей работе установлено, что микроорганизмы рода Rhodococcus хранятся лучше Pseudomonas. Так, для клеток родококков в контроле без консерванта выживаемость через два месяца составила 0,9%, а для псевдомонад – 0,1%, что почти на порядок ниже. Для вариантов с бензоатом разница в выживаемости оказалась ещё больше: 3% и 0,2%, соответственно.

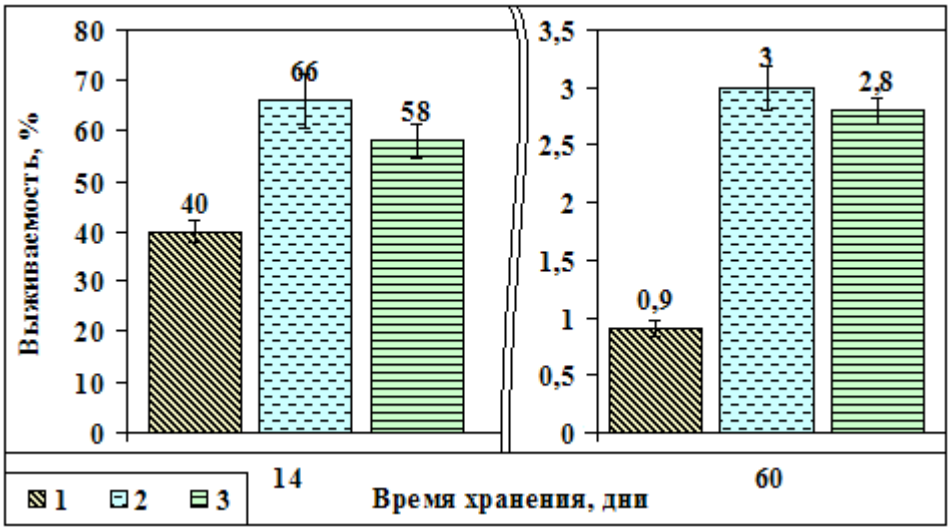


Рис. 97 Сравнение выживаемости микроорганизмов штамма Rhodococcus sp. S67 при хранении в жидкой форме: 1 – нативная биомасса; 2 – биомасса с бензоатом натрия; 3 – биомасса с глутаматом натрия.

В работе Борзенкова с соавт. (1998) хранение биопрепарата «Деворойл» (консорциум углеводородокисляющих микроорганизмов *Rhodococcus maris, Rhodococcus erythropolis, Pseudomonas stutzeri, Yarrowia lipolytica*) осуществляли при 5ºС с добавлением хлорида натрия, бетаина и смеси витаминов. Через месяц численность микроорганизмов снизилась в 100 раз, то есть выживаемость не превышала 1%. Сравнение этих данных с результатами, достигнутыми в нашей работе, говорит о высокой эффективности хранения биомассы микроорганизмов-нефтедеструкторов в жидкой форме с добавлением 0,2% раствора бензоата натрия.

Проверка способности микроорганизмов к росту на углеводородных субстратах (нефть, ДТ, гексадекан) показала (п. 3.9.1), что для всех вариантов не зависимо от выживаемости эта способность сохраняется. Это свидетельствует о сохранении деградативной активности бактерий, что позволяет использовать их для биоремедиации после хранения.

Можно заключить, что в жидкой форме хранение биомассы рационально осуществлять не более двух недель для псевдомонад и одного месяца для родококков. Внесение консервантов при этом оказывает различное действие, но для указанных

сроков микроорганизмы *P. fluorescens* 142NF и *Rhodococcus* sp. S67 лучше хранить с добавлением 0,2% раствора бензоата натрия. Соблюдение этих условий позволит сохранить 50% жизнеспособных клеток в биопрепарате.

Для хранения в течение более длительного времени биомассу необходимо подвергать дополнительной обработке: замораживанию, лиофилизации или высушиванию.

Известно, что замораживание обеспечивает сохранение различных биологических объектов, в том числе и бактериальных клеток, в течение длительного времени (Криоконсервирование клеточных суспензий, 1983). Борзенков с соавторами (1998) изучали хранение биопрепарата в течение 30 дней в виде суспензии биомассы с 10% NaCl и добавками витаминов и осмопротектора бетаина, варьируя температуру хранения от +5 до -10ºС. Оптимальной температурой была -10ºС: при ней не было отмечено падения численности микроорганизмов. В нашей работе численность микроорганизмов, хранящихся в замороженном виде при -20ºС, проверяли через два месяца. Поскольку замораживание вызывает гибель клеток, то был использован защитный раствор: 20% раствор сахарозы, смешанный с биомассой в массовом отношении 1:1.

Как показывает анализ данных, представленных в табл. 34, хранение биомассы в замороженном виде позволяет сохранить значительно больше жизнеспособных микроорганизмов, чем в жидкой форме при 2-4°С. Выживаемость замороженной культуры псевдомонад была выше в 30 раз, чем у жидкой культуры с бензоатом натрия, а родококков – в 13.

Таким образом, замораживание биомассы с 20% раствором сахарозы в качестве криопротектора является хорошим способом сохранить достаточно высокую численность микроорганизмов при длительном хранении. Однако такой способ сохранения жизнеспособности микробных клеток не всегда может быть удобен, а именно при наработке больших объёмов биопрепарата. Кроме этого, следует избегать размораживания биомассы, так как повторное замораживание вновь вызовет гибель микробных клеток.

Сухой биопрепарат хранится дольше, но при сублимационном высушивании клетки подвергаются воздействию различных повреждающих факторов, так что значительная часть их гибнет уже в процессе сушки (Miyamoto-Shinohara et al., 2000). В нашей работе для сохранения жизнеспособности клеток, биомассу перед заморозкой смешивали с различными защитными средами: сахароза; сахароза и тиомочевина; сахароза, тиомочевина и полиглюкин.

Несмотря на большое количество экспериментальных данных о влиянии защитных сред разного состава на выживаемость микроорганизмов различных таксономических групп при лиофилизации (Miyamoto-Shinohara et al. 2008), фундаментальных количественных закономерностей не выявлено. В связи с этим, теоретическое предсказание эффективности той или иной защитной среды практически невозможно, что делает поиск новых эффективных растворов экспериментальной задачей.

В результате сравнения выживаемости (рис. 71) микробных клеток после лиофилизации, установлено, что наилучшей защитной средой для псевдомонад является 20% раствор сахарозы, а для родококков – раствор, содержащий 8% сахарозы, 4% тиомочевины и 4% полиглюкина. Выживаемость родококков оказалась выше, чем псевдомонад, что согласуется с результатами, полученными при хранении биомассы в жидкой форме, что свидетельствует о более высокой устойчивости родококков к различным стрессовым воздействиям по сравнению с псевдомонадами. Это соответствует существующим данным о том, что грамположительные бактерии лучше переносят воздействие различных повреждающих факторов (Miyamoto-Shinohara et al. 2000). Предполагают, что это связано с толщиной пептидогликанового слоя, который значительно тоньше у грамотрицательных микроорганизмов, что может являться причиной разрыва клеточной стенки при замерзании.

Анализ полученных результатов позволяет заключить, что для псевдомонад роль защитной среды в сохранении жизнеспособности клеток значительно выше, чем для родококков (рис. 71). Соотношение выживаемостей у лучшего и худшего вариантов у псевдомонад составило 16:1, а у родококков – всего 4:1. Очевидно, что для микроорганизмов, лучше переносящих стрессовые воздействия, влияние состава защитной среды не так существенно.

Установить влияние состава защитных сред на сохранение жизнеспособности микроорганизмов в течение дальнейшего хранения трудно. По результатам исследования длительного хранения лиофилизированных культур можно сделать вывод, что среда, обеспечивающая максимальную выживаемость микроорганизмов при лиофилизации, не обязательно обеспечит хорошее сохранение их численности при дальнейшем хранении. Так, защитный эффект раствора сахарозы был очень сильно выражен для клеток штамма *P. fluorescens* 142NF, но скорость их гибели при хранении отличалась незначительно от остальных образцов, особенно за первый месяц: численность жизнеспособных клеток во всех трёх вариантах снизилась на 64-72% (рис. 98). После шести месяцев хранения отношение максимальной и

минимальной численностей микроорганизмов в лиофилизированных образцах составило всего 2,5:1, тогда как сразу после лиофилизации – 16:1. Анализ динамики выживаемости для микроорганизмов штамма *Rhodococcus* sp. S67 подтверждает отсутствие строгой корреляции между действием защитной среды при лиофилизации и при последующем хранении (рис. 99). Так, наибольшее содержание жизнеспособных клеток через полгода хранения достигнута в варианте «сахараза+тиомочевина+полиглюкин»: $1,7\times10^9$ КОЕ/мг, что соответствует 0,25% выживаемости, но в процентном отношении выживаемость максимальная в варианте «сахароза+тиомочевина": 0,36% при численности $6,1\times10^8$ КОЕ/мг. Несмотря на это, очевидно, что основной вклад в сохранение высокой численности жизнеспособных микроорганизмов в сухом препарате вносит влияние защитной среды непосредственно при лиофилизации, а не при последующем хранении. На практике это означает отсутствие необходимости сравнивать изменение численности клеток во времени, достаточно выбрать оптимальный защитный раствор для сублимационной сушки.

Альтернативой сублимационному высушиванию является сушка при атмосферном давлении при температуре, незначительно превышающей комнатную (35-40°С). При таком способе биомассу микроорганизмов не нужно замораживать и подвергать воздействию вакуума. Одним из вариантов является контактная сушка, при которой биомассу микроорганизмов смешивают с сорбентом влаги для наилучшего обезвоживания.

В нашей работе описан новый способ получения сухой формы микроорганизмов-нефтедеструкторов (биопрепарата) методом контактной сушки. В качестве сорбента-носителя для контактной сушки был выбран вспученный перлитовый песок, который получают высокотемпературным обжигом водосодержащего вулканического стекла, называемого перлитом. Это легкий, инертный, негорючий, нетоксичный материал. Обладая высокой открытой пористостью (до 75%), перлитовый песок в течение 3-5 минут впитывает 10 г воды на 1 г сорбента. Эти качества делают его удобным носителем для микроорганизмов.

Как видно из данных рис. 71, выживаемость микроорганизмов, после контактной сушки, значительно выше, чем лиофильной. Следует отметить, что использование контактной сушки значительней выгоднее, так как не требует использования дорогостоящих морозильных камер и установок для лиофильной сушки.

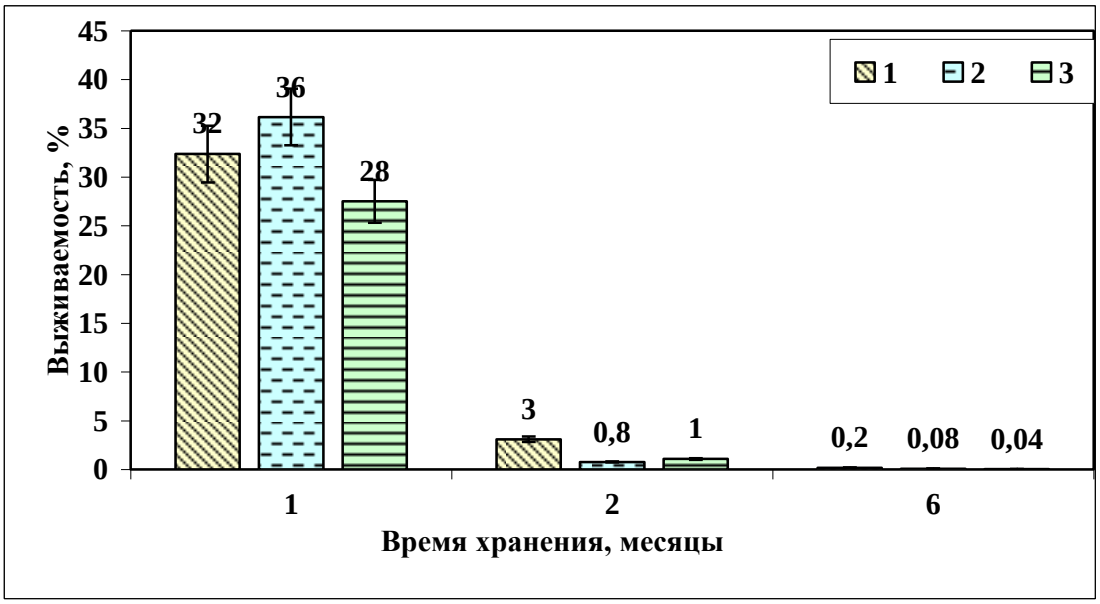


Рис. 98 Динамика выживаемости микроорганизмов P. fluorescens 142NF при хранении в лиофилизированном виде с защитными средами: 1 – 20% сахароза; 2 – 10% сахароза, 6% мочевина; 3 – 8% сахароза, 4% мочевина, 4%полиглюкин

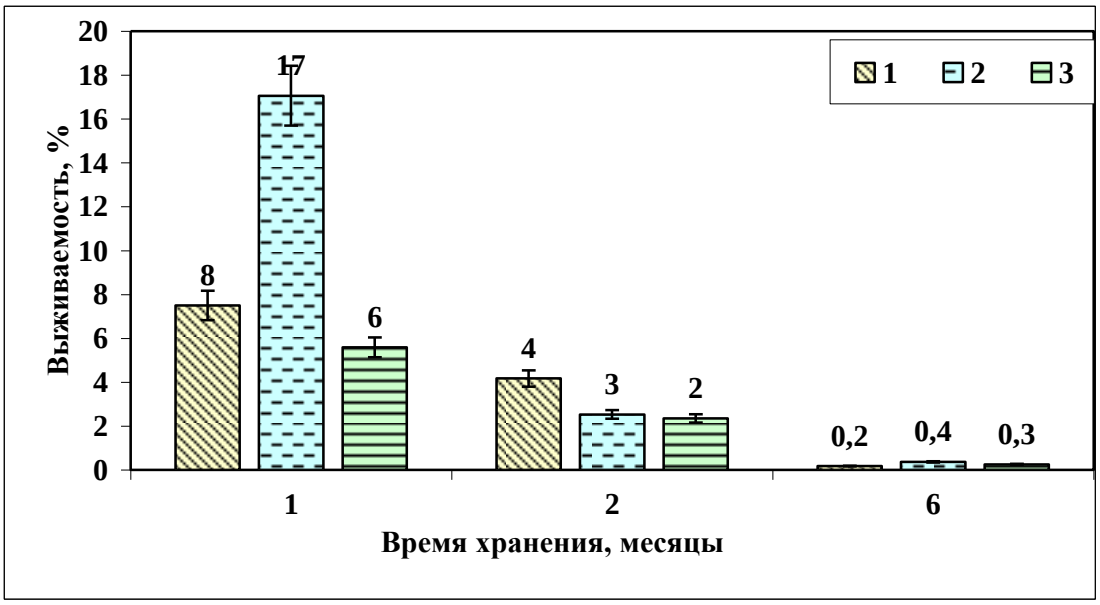


Рис. 99 Динамика выживаемости микроорганизмов Rhodococcus sp. S67 при хранении в лиофилизированном виде с защитными средами: 1 – 20% сахароза; 2 – 10% сахароза, 6% мочевина; 3 – 8% сахароза, 4% мочевина, 4% полиглюкин.

Однако, несмотря все указанные преимущества, полагают, что лиофилизация обеспечивает большую стабильность при хранении для широкого круга микроорганизмов, чем высушивание при обычных условиях, поскольку происходит значительно более полное удаление влаги из препарата (Долинов, 1969). Для

сравнения выживаемости микроорганизмов, высушенных разными способами, соответствующие образцы хранили при комнатной температуре, сравнивая численность жизнеспособных микроорганизмов через 1, 2 и 6 месяцев.

Как показывает анализ данных, представленных в табл. 51, прямой зависимости между скоростью гибели клеток и типом высушивания не наблюдается. Так, для псевдомонад выживаемость за первый месяц на 19% выше для образцов, полученных лиофильной сушкой. Для родококков наблюдается обратная картина: в два раза выше выживаемость бактерий в препарате, полученном контактной сушкой. За полгода процент жизнеспособных клеток стал сравним для обоих типов сушки. Таким образом, можно полагать, что для длительного хранения изученных культур способ высушивания не имеет определяющего значения. Возможно, это объясняется тем, что за такой период времени различия в структуре образцов, подвергнутых разным типам сушки, нивелируются за счёт воздействия факторов, вызывающих гибель клеток. Несмотря на это, использование контактной сушки предпочтительней, так как абсолютная численность клеток будет выше, за счёт более высокой их выживаемости в процессе сушки, а материальные затраты на получение готовой сухой формы биопрепарата значительно ниже.

Кроме способа подготовки биоматериала к длительному хранению, для достижения наилучших показателей необходимо соблюдение оптимальных условий хранения. Температурный режим относится к факторам, наиболее сильно влияющим на выживаемость микроорганизмов. Для высушенных культур микроорганизмов закономерно увеличение выживаемости при снижении температуры хранения (Долинов, 1969).

Из данных рис. 100 и 101 видно, что для исследованных в данной работе штаммов бактерий наблюдается аналогичная закономерность. За полгода выживаемость микроорганизмов, хранящихся при температуре -20°С, значительно выше, чем в других образцах. Возможно это происходит за счёт снижения скорости окислительных процессов, происходящих в клетках (Биохимия мембран, 1987). Важно отметить, что основная гибель клеток приходится на первый месяц хранения. Для вариантов, хранящихся при –20°С, за полгода погибло 76-80% микроорганизмов, из них 68-78% – уже за первый месяц. Причиной гибели является частичная регидратация бактериальных клеток, так как сухой материал начинает поглощать остаточную влагу, содержащуюся в упаковке. Как следствие, происходит аутоинтоксикация, обусловленная сохранением активности некоторых ферментов даже при низких температурах (Joslyn, 1951). Таким образом, продолжающийся обмен

веществ обуславливает старение клетки, и продолжительность её жизни оказывается сильно ограничена.

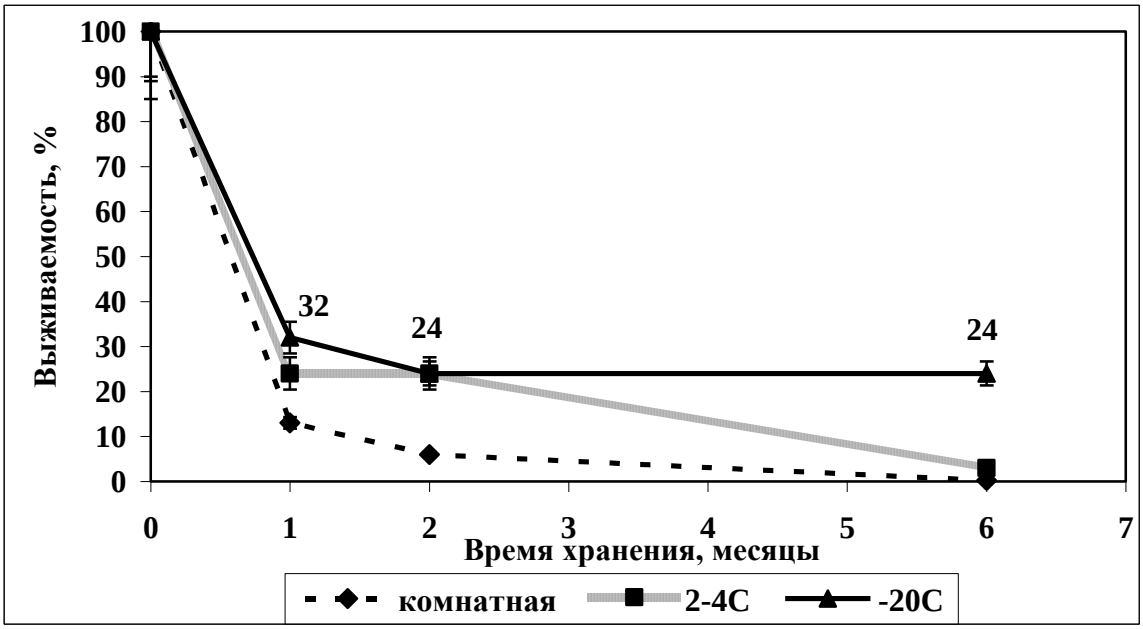


Рис. 100 Динамика выживаемости микроорганизмов штамма P. fluorescens 142NF после контактной сушки в течение хранения при различных температурах

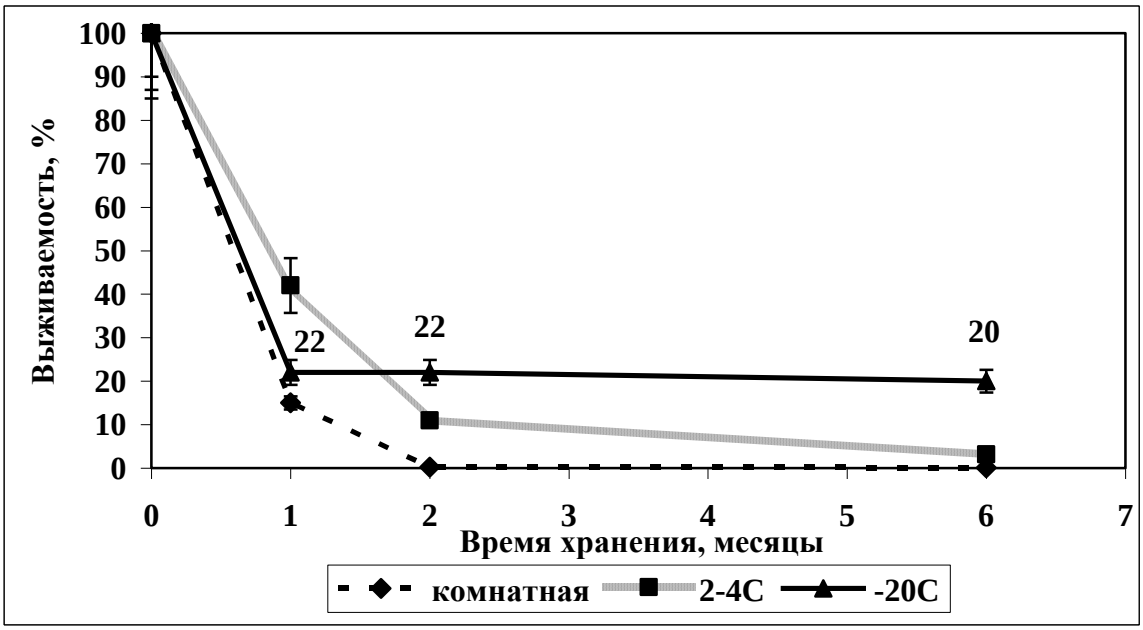


Рис. 101 Динамика выживаемости микроорганизмов штамма Rhodococcus sp. S67 после контактной сушки в течение хранения при различных температурах

Табл. 51. Выживаемость микроорганизмов (%) при хранении после различных способов высушивания при комнатной температуре.

Штамм	Тип сушки	Время хранения, мес.		
		1	2	6
P. fluorescens 142NF	Контактная	13±2%	6±2%	0,2±0,1%
	Лиофильная[1)]	32±5%	3±1%	0,2±0,1%
Rhodococcus sp. S67	Контактная	15±3%	0,2±0,1%	0,1±0,1%
	Лиофильная[1)]	6±1%	2±1%	0,3±0,1%

[1)] – указан вариант с максимальной выживаемостью среди трёх изученных защитных сред

Известно, что при высушивании микроорганизмы могут утрачивать свои свойства, в том числе и за счёт потери плазмид (Yoon 2005). В настоящей работе проверяли деградативную активность препаратов и фенотипическую стабильность плазмиды биодеградации нафталина штамма *P. fluorescens* 142NF после высушивания. На плазмиде pNF142, присутствующей в штамме *P. fluorescens* 142NF, локализованы гены, контролирующие деградацию полиароматических субстратов, в частности, нафталина. При культивировании на среде, содержащей такой субстрат в качестве единственного источника углевода и энергии, рост будет наблюдаться только в том случае, если сохранится плазмида. Проверка способности утилизировать нафталин показала 100% сохранение плазмиды во всех вариантах хранения микроорганизма *P. fluorescens* 142NF (п. 3.9.2).

Для количественной оценки эффективности действия биопрепаратов, полученных контактной сушкой, проводили лабораторный модельный эксперимент по определению деградирующей способности микроорганизмов (Рис. 72). При этом сравнивали эффективность деградации нефти микроорганизмами *P. fluorescens* 142NF и *Rhodococcus* sp. S67, оживлёнными из лиофилизированных препаратов, хранившихся в течение 2 недель при температуре -20°C, со свежей жидкой культурой тех же микроорганизмов, выращенных на среде Лурия-Бетани. Как видно из данных рис. 72, для микроорганизмов штамма *P. fluorescens* 142NF наблюдается небольшое снижение степени деструкции нефти при использовании сухого биопрепарата. Это можно объяснить частичной гибелью клеток и снижением активности за счёт стрессового воздействия различных факторов при высушивании и хранении. Однако, общий уровень убыли нефти, составивший 14%, говорит о сохранении достаточно

высокой нефтеокисляющей активности. Кроме того, разница может быть компенсирована за счёт увеличения вносимой дозы биопрепарата. Степени деградации нефти для сухого биопрепарата и свежей культуры бактерий *Rhodococcus* sp. S67 практически совпадают, что свидетельствует о высокой эффективности выбранного способа хранения в отношении данного микроорганизма.

Таким образом, на основе полученных результатов можно осуществить оптимизацию режимов получения биомассы микроорганизмов-нефтедеструкторов, входящих в состав биопрепаратов для очистки окружающей среды от нефтезагрязнений. Из исследованных способов хранения бактерий новый способ контактной сушки обеспечивает наилучшее сохранение жизнеспособности и деградативной активности углеводородокисляющих бактерий. Разработанный новый способ получения сухой формы биопрепарата для очистки территорий от нефтяных загрязнений защищён патентом РФ.

4.10 Мониторинг интродуцированных в окружающую среду штаммов-нефтедеструкторов

Мониторинг интродуцированных в окружающую среду микроорганизмов с целью проследить за их судьбой, оценить их выживаемость и конкурентоспособность – задача крайне важная, но методически непростая и трудоёмкая. Используемые для этого подходы условно можно разделить на микробиологические и молекулярно-генетические. К первым относят методы, позволяющие сравнительно быстро, путем одной-двух процедур идентифицировать отличительные признаки (свойства) исследуемых микроорганизмов в пробах, отобранных из окружающей среды, например, устойчивость к антибиотикам, тяжёлым металлам, способность утилизировать различные субстраты. Ко вторым относят более сложные и многоэтапные методики, например, такие как ПЦР с праймерами, специфичными для определённых генов, гибридизация выделенной ДНК микроорганизмов с ДНК-зондом.

Для надёжного обнаружения в пробах исследуемых микроорганизмов, как правило, необходимо наличие у них нескольких характерных признаков. Для этого необходимо знать культурально- морфологические, метаболические и генетические свойства изучаемых штаммов.

Как наиболее простой признак, ряд авторов использовали морфологию колоний для мониторинга бактерий-деструкторов 2,2-дихлорпропионата (Brokamp and Schmidt,

1991), 2,5-дихлорбензоата (Crowley et al., 1996) и 2,4-дихлорфеноксиацетата (DiGiovanni et al., 1996) с применением дифференциально-диагностических сред. Ауксотрофность бактерий была использована в экспериментах по изучению переноса катаболических генов и плазмид, она упрощает изоляцию трансконъюгантов и слежение за донором. Так, группа Евы Топ (Top et al., 1999; Dejonghe et al., 2000) использовала в качестве донора ауксотрофный по лейцину, изолейцину и валину штамм *P. putida* UWC3(pEMT1k), а Де Липтхе с соавторами (De Lipthay et al., 2001) – ауксотрофный штамм *E. coli* HB101(pRO103). Однако, получение ауксотрофных мутантов природных штаммов-деструкторов нефти вряд ли оправдано, поскольку мутагенез может отрицательно повлиять на деградативные свойства и жизнеспособность бактерий.

Для удобства визуализации штаммов в различных модельных системах часто используют репортерные гены, контролирующие флюоресценцию и люминесценцию (гены *luc, lux, gfp, ds-Red*), которые встраивают в геном исследуемого микроорганизма путём транспозонного мутагенеза, трансформации или конъюгации. Краули с соавт. (Crowley et al., 1996) целенаправленно трансформировали штамм *Pseudomonas fluorescens* 2-79 RLD маркером Tn7-*lux*CDABE (последний является опероном, кодирующим люциферазу, белок люминесценции) для простоты идентификации. В другой работе (Christensen et al., 1998) была сконструирована система штаммов и плазмиды pWW0, меченной геном *gfpmut*3b, для непосредственного слежения за образованием трансконъюгантов под микроскопом в УФ-свете по зеленой флюоресценции Gfp-белка. Полученные рекомбинантные микроорганизмы удобно использовать в лабораторных экспериментах, но необходимы дополнительные исследования, чтобы исключить негативные последствия инсерции репортерных генов на функции и свойства микроорганизма.

В ряде случаев для выявления штаммов-деструкторов применяются индикаторные среды. Так, колонии штамма *P. fluorescens* R2F, разлагающего галоалкановую кислоту, учитывали на pH-индикаторном агаре (Brokamp and Schmidt, 1991). Ньюби и Пеппер (Newby and Pepper, 2002) подсчитывали колонии, деградирующие 2,4-дихлорфеноксиацетат на чашках с этим ксенобиотиком и дифференциально-диагностическим агаром Эндо, содержавшем эозин B и метиленовый синий. Клетки микроорганизмов *Burkholderia, Pseudomonas* (Newby et al., 2000b), *Ralstonia* (Newby et al., 2000a) минерализовавшие 2,4-дихлорфеноксиацетат, формировали на среде Эндо темно-пурпурные колонии. Дейонге с соавт. (Dejonghe et al., 2000) использовали минеральную среду ММО с 2,4-

дихлорфеноксиацетатом и 5-бром-4-хор-3-индолил-*β*Д-галактопиранозидом, на которой колонии штаммов-деструкторов приобретали синюю окраску.

Антибиотикорезистентность наряду с морфологией колоний широко применяется для мониторинга штаммов в различных экспериментах, в том числе и в генетических исследованиях. Часто используются спонтанные мутанты, получаемые при культивировании штамма в среде, содержащей антибиотик рифампицин (Daane et al., 1996; Dejonghe et al., 2000; Top et al., 1999; Christensen et al., 1998; Sarand et al., 2000; Brokamp and Schmidt, 1991; Nüβlein et al., 1992), стрептомицин (Crowley et al., 1996; Fulthorpe and Wyndham, 1992; De Lipthay et al., 2001), налидиксовую кислоту (Top et al., 1998; Christensen et al., 1998) и тетрациклин (Normander et al., 1998).

Множественная антибиотикорезистентность штаммов позволяет достаточно точно проводить мониторинг бактерий в различных модельных системах (Latha and Lalithakumari, 2001; Daane et al., 1997; Hill et al., 1994).

В нашей работе для слежения за судьбой штаммов, входящих в биопрепарат «МикроБак» как в лабораторных экспериментах, так и в открытой окружающей среде был выполнен анализ их культурально-морфологических признаков, метаболических и фенотипических характеристик (Табл. 9 – 11), а также проведено генотипирование штаммов родококков.

Представителей рода *Pseudomonas* различали по культурально-морфологическим признакам (размер и форма колоний), а также по устойчивости к различным антибиотикам: для 142NF – ампициллин 500, для BS3701 – рифампицин 100, к которым были устойчивы отдельные интродуцированные штаммы. Дополнительным маркером для штамма BS3701 было ярко-зелёное свечение колоний в ультрафиолетовом свете (λ=254 нм) при росте на агаризованной среде Кинга Б.

Для определения штаммов родококков, входящих в состав микробных ассоциаций «МикроБак» и «ВиО», было проведено генотипирование, поскольку эти штаммы были очень схожи между собой по культурально-морфологическим признакам. С этой целью применяли RAPD анализ с использованием 4 праймеров: OA20 (GTTGCGATCC), OG06 (GTGCCTAACC), OS09 (TCCTGGTCCC) и OS14 (AAAGGGGTCC). Наибольшие различия между штаммами были выявлены при использовании праймера OA20 (Рис. 64), который в дальнейшем был использован для мониторинга штаммов родококков в смешанных микробных популяциях и после их интродукции в окружающую среду. Дополнительными маркерами для штаммов родококков была их антибиотикорезистентность: *Rhodococcus erythropolis* S26 устойчив к стрептомицину, *Rhodococcus* sp. S67 – к канамицину, а *Rhodococcus* sp. X5

– к цефазолину, клафорану и гентамицину (Табл. 10).

Используя RAPD анализ с праймером OA20 (Рис. 73) было показано, что при селекции микроорганизмов-нефтедеструкторов в жидкой среде с целью получения микробной ассоциации, как основы биопрепарата «МикроБак», после 10 суток культивирования на нефти 80% общей популяции родококков было представлено штаммами *Rhodococcus* sp. S67 и *Rhodococcus* sp. X5 при 24°C, а при 4°C эти же два штамма составляли 70% общей популяции родококков (п.3.5.1.2).

С помощью разработанного метода мониторинга впервые удалось проследить за судьбой интродуцированных микроорганизмов-деструкторов нефти опытного образца биопрепарата «МикроБак» нефти в условиях полевого эксперимента и показать их конкурентоспособность (данные раздела 3.11). На протяжении 6 месяцев эксперимента доля интродуцированных штаммов составляла от 1% до 78 % от общей численности почвенных микроорганизмов-деструкторов.

4.11 Применение опытного образца биопрепарата «МикроБак» для биоремедиации почвы, загрязненной нефтью, в условиях полевого эксперимента

При проведении полевого эксперимента (Рис. 74) в течение первых 30 суток наблюдалось увеличение микробной популяции как гетеротрофов, так и углеводородокисляющих микроорганизмов (Рис.75). Возможно, это связано с тем, что во время подготовки к данному эксперименту были улучшены такие характеристики почвы, как её структура, воздухо- и влагообмен за счёт удаления дёрна и рыхления. Кроме того, увеличение численности микробной популяции может быть вызвано внесением нефти, как было показано в работе Делилля с соавторами (Delille et al., 2007). В работе Чугунова с соавторами (Чугунов и др., 2000) показано, что при проведении полевого эксперимента на дерново-подзолистой почве (в летний сезон, июнь-август) под влиянием нефтяного загрязнителя в начале эксперимента, наоборот, резко уменьшилась общая численность микроорганизмов. Через месяц численность различных групп микроорганизмов начала приближаться к исходному уровню. Исходная численность деструкторов углеводородов была $2{,}2\times10^{5}$ КОЕ/г почвы. Значительное увеличение их популяции наблюдали после 3 месяцев загрязнения.

Следует отметить, что в нашем эксперименте численность микробной популяции (и гетеротрофов, и нефтедеструкторов) в участке 4 с внесением удобрения и интродукцией микроорганизмов оставалась максимальной с сентября 2006 г. по

сентябрь 2007 г. Этот факт демонстрирует, что условия окружающей среды, такие как температура, влажность почвы, доступность кислорода и наличие дополнительных источников азота, фосфора и калия, были благоприятными для развития микроорганизмов. Численность и гетеротрофов, и нефтедеструкторов с октября постепенно снижалась, а, начиная с марта, повышалась во всех экспериментальных участках.

Однако существуют ситуации, когда биодеградация поллютантов за счёт природных микроорганизмов неэффективна. Например, в северных районах, где аборигенная микрофлора в условиях непродолжительного летнего периода развивается медленно, наиболее эффективным методом биоремедиации является интродукция углеводородокисляющих микроорганизмов. В полевых (Mohn et al., 2001) и лабораторных экспериментах (Mohn and Stewart, 2000) было продемонстрировано, что биоаугментация с использованием накопительной культуры с плотностью микробных клеток 10^8 КОЕ/г почвы не увеличила скорость деградации или количество удалённых углеводородов нефти после 65 суток эксперимента. Средняя дневная температура сайта изменялась в диапазоне от 10ºС до -14ºС на протяжении эксперимента. И полевой, и лабораторный эксперименты показали, что биоремедиация арктической почвы, загрязненной дизельным топливом, возможна непосредственно на месте загрязнения при низких температурах окружающей среды только за счёт биостимуляции дополнительными источниками азота и фосфора. В работе Бенто с соавторами (Bento et al., 2005) наибольшая скорость деградации (63-84%) лёгких фракций (C_{12}-C_{23}) наблюдалась на протяжении 12 недель в случае биоаугментации (сразу после первой недели было 84%, затем уменьшение деградации). Добавление питательных веществ в этой почве вызвало значительную деградацию (72%) лёгких фракций только после 6 недель инкубации. Картина деградации тяжёлых фракций (C_{23}-C_{40}) в почве была подобна лёгким фракциям (Bento et al., 2005). В начале эксперимента микроорганизмы-деструкторы дизельного топлива были стимулированы легко окисляемыми углеводородными источниками (вероятно, линейными углеводородами), которые индуцировали высокий процент деградации. По мере того как концентрации этих веществ уменьшались, микробная популяция начинала использовать более устойчивые углеводороды (вероятно, полиароматические углеводороды) более эффективно. Со снижением концентрации доступного источника углерода питательные вещества, по всей вероятности, уже не оказывают стимулирующего действия на микроорганизмы. Также возможно, что

деградация высокомолекулярных углеводородов может приводить к образованию токсичных интермедиатов, которые могут ингибировать рост микроорганизмов-деструкторов.

Добавление бактериального консорциума и биогенных элементов способствовало снижению содержания углеводородов нефти в почве в течение 120 суток на 48,5%, а добавление одного удобрения без микроорганизмов привело к деградации только на 17% (Mishra et al., 2001). Эффективность деградации дизельного топлива в микрокосмах, обработанных бактериальной суспензией, показана в работе Маркес-Роша с соавторами (Marquez-Rocha et al., 2001) и составляла около 85% в лабораторных и полевых испытаниях. Наибольший уровень очистки почвы (90%) был достигнут при проведении полевого эксперимента с использованием и бактериального консорциума, и биогенных добавок в виде нитрата аммония.

В нашей работе (п. 3.11) с помощью разработанного метода мониторинга впервые удалось проследить за судьбой интродуцированных микроорганизмов при проведении полевого эксперимента. На протяжении всего эксперимента в открытой окружающей среде общая численность внесённых микроорганизмов не опускалась ниже чем $2{,}6\times10^{6}$ КОЕ/г почвы. Такая численность интродуцированных микроорганизмов поддерживалась на этом уровне в течение первых двух месяцев эксперимента, затем происходило уменьшение их численности на один порядок. Однако аналогичная картина наблюдалась и для общей численности нефтедеструкторов в этот промежуток времени (октябрь 2006 – март 2007 гг.), но процентное содержание интродуцированной ассоциации было на достаточно высоком уровне, и что самое главное, было максимальным для этого участка после 120 дней (т.е. в январе 2007 г.) – 29,4%, т.е. именно интродукция психротрофных микроорганизмов привела к таким результатам. Особого внимания заслуживает тот факт, что численность интродуцированной ассоциации по отношению к общей численности нефтедеструкторов возрастала от 1 до 79% на протяжении 6 месяцев эксперимента, что свидетельствует о выживаемости внесённых микроорганизмов в почве в открытой окружающей среде.

Температура оказывает влияние не только на скорость биодеградации, но на физико-химические свойства углеводородов (Whyte et al., 1998; Rowland et al., 2000). Хотя микробная активность, как правило, снижается при низких температурах, многие компоненты нефти и дизельного топлива могут быть действительно деградированы психрофильными и психротрофными микроорганизмами. Работы ряда авторов

подтвердили, что при низких температурах (0-7ºС) возможна биодеградация нефтепродуктов аборигенными микроорганизмами (Eriksson et al., 2001). В работе Кулона с соавторами (Coulon et al., 2005) показано, что биоремедиация почвы, загрязнённой углеводородами, происходила при низкой температуре (4ºС). Увеличение температуры до 10-20ºС ускоряло биоремедиацию.

При проведении наших экспериментов в открытой окружающей среде температура почвы изменялась в диапазоне от 0ºС до 23ºС, но, несмотря на это, численность интродуцированной микробной ассоциации оставалась на достаточно высоком уровне. Поскольку интродуцированные нами микроорганизмы являются психротрофными (с диапазоном роста 2-32ºС) они выжили в почве даже в зимний период эксперимента и процесс деградации нефти происходил даже в этот период времени, только с меньшей скоростью (за 70 суток (с декабря 2006 по февраль 2007) – содержание нефти в почве уменьшилось на 12%).

На протяжении 12 месяцев исследований степень деградации нефти в полевых условиях в участке с интродукцией микроорганизмов и внесением удобрения была выше, чем в контрольном участке. При обработке загрязнённых участков микробной ассоциацией совместно с удобрением наблюдалось значительное снижение содержания остаточной нефти, что связано в первую очередь с увеличением числа углеводородокисляющих микроорганизмов на 4 порядка. Большая часть нефти была деградирована за первые два месяца эксперимента, степень деградации составила 33,9%, а в контрольном участке - 21,6%. Добавление азота и фосфора, увлажнение, достаточная аэрация стимулировали активный процесс биодеградации нефти. В то же время следует отметить, что эти же условия активировали и нефтеокисляющую аборигенную микрофлору почвы, что способствовало интенсификации процессов самоочищения нефтезагрязнённой почвы. В дальнейшем также происходила убыль нефти во всех участках и после 1 года составляла 49,1% и 37,5% для участков 4 и 2, соответственно. Снижение температуры воздуха и почвы в ноябре-январе не привело к прекращению процесса деградации нефти, что, возможно, связано с интродукцией ассоциации психротрофных микроорганизмов-деструкторов.

На заключительном этапе очистке загрязнённой нефтью почвы в полевом эксперименте использовали овёс в качестве биоиндикатора. Полученные через месяц результаты продемонстрировали снижение фитотоксичности почвы после интродукции ассоциации штаммов-деструкторов (рис. 78).

4.12 Полевые испытания опытного образца биопрепарата «МикроБак» по очистке грунта от загрязнений нефтью и нефтепродуктами на территории ОАО «Тульская Топливно-Энергетическая Компания»

На основе отселектированной микробной ассоциации была приготовлена опытная партия жидкой формы биопрепарата «МикроБак». Эффективность опытного образца биопрепарата продемонстрировали при проведении полевых испытаний по очистке грунта от загрязнений нефтью и нефтепродуктами на территории ОАО «Тульская Топливно-Энергетическая Компания» в период с сентября по ноябрь 2007 года. Грунт, загрязнённый нефтепродуктами (газовый конденсат, дизельное топливо, бензин, мазут), представлял собой смесь песка и глинистой почвы. Было установлено, что через месяц после внесения биопрепарата и минеральных удобрений в опытном участке степень очистки грунта от нефтепродуктов составила 99,6%, при этом степень очистки в контрольном участке была 90,7%. Полученные результаты подтверждены результатами химического и микробиологического анализов. Сравнительно небольшая разница в остаточной концентрации нефтепродуктов опытного участка по сравнению с контрольным связана, во-первых, с физико-химическими свойствами загрязнителя, который в значительной степени был подвержен убыли за счет испарения и фотоокисления. Во-вторых, результаты микробиологического анализа показали, что численность аборигенной углеводородокисляющей микрофлоры составляла от $8{,}0\times10^{4}$ до $1{,}8\times10^{6}$ КОЕ/г грунта, т.е. была на достаточно высоком уровне, что объясняется длительным загрязнением нефтепродуктами. В результате, после двух месяцев степень очистки контрольного участка составляла 99,8%.

Данные, полученные при проведении полевых испытаний опытной партии разработанного нами биопрепарата, согласуются с результатами по биоремедиации загрязнённых территорий с помощью других биопрепаратов. Однако следует учитывать тот факт, что нами полевые испытания проводились в широком температурном диапазоне. Например, полевые испытания биопрепарата «Родер» показали очень высокую эффективность при ремедиации открытых акваторий, особенно при низком уровне загрязнения (после трёхкратной обработки степень очистки составляла более 99%). При более высоком уровне загрязнения, а также при нефтяных разливах на болотах и грунтах оптимальная стратегия их ремедиации должна включать или предварительный механический сбор нефти или применение адсорбентов, или другие методы предварительной обработки, сопровождаемые доочисткой микробиологическими методами.

Таким образом, испытанный биопрепарат «МикроБак» может быть рекомендован для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами в регионах с холодным и умеренным климатом. Эксперименты в открытой окружающей среде и полевые испытания продемонстрировали эффективность опытного образца биопрепарата в отношении сырой нефти и смеси нефтепродуктов (газовый конденсат, дизельное топливо, бензин, мазут). Интродукция микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти и внесение минерального удобрения ускорила очистку по сравнению с действием аборигенных бактерий. Важно отметить, что полевые эксперименты и полевые испытания проводились в широком температурном диапазоне в осенне-зимний период, в том числе при низких температурах. Интродуцированные микроорганизмы оказались конкурентоспособны и выжили при пониженных температурах, тогда как численность аборигенных нефтедеструкторов сокращалась. Тем не менее доля интродуцированных штаммов увеличивалась и достигала до 78% от общей популяции нефтедеструкторов даже через 6 месяцев, когда остаточные нефтепродукты были представлены в основном тяжёлыми фракциями нефти, но процесс биодеградации продолжался, хотя и с меньшей скоростью.

Полученные результаты по изучению деструкции нефти психротрофными микроорганизмами и их ассоциациями в жидкой минеральной среде, модельных почвенных системах и полевых экспериментах создают предпосылки для дальнейших более детальных исследований особенностей и механизмов биодеградации углеводородов нефти в экстремальных условиях окружающей среды.

4.13 Разработка растительно-микробных ассоциаций для биоремедиации нефтезагрязненных почв и оценка их эффективности при деградации нефти в стерильных модельных почвенных системах

Помимо микроорганизмов значительную роль в процессе деградации различных поллютантов, в том числе ПАУ и сырой нефти, играют растения. Поэтому, при разработке современных и эффективных технологий очистки почвы от нефти и нефтепродуктов, целесообразно сочетать свойства растений и микроорганизмов-деструкторов, ассоциированных с ними. Фиторемедиация является эффективным и дешёвым методом, включающим такие процессы как ризоремедиация, фитостабилизация, фитоэкстракция, фитоволатилизация (Siunova et al., 2011; Salt et al., 1998; Pilon-Smits, 2005). Численность микробных популяций в ризосфере растений

часто значительно выше, чем в той же почве без растений (Lynch and Whipps, 1990; Anderson and Coats, 1995).

В нашей работе для разработки эффективных растительно-микробных ассоциаций был проведен скрининг более 20 видов различных растений (Табл. 48). В первую очередь, учитывалась устойчивость растений к загрязнению нефтью (2%). В результате наиболее устойчивыми к нефтезагрязнению оказались некоторые бобовые (горох, фасоль), подсолнечник, кукуруза, ячмень и газонная трава (смесь, основу которой составляет овсяница красная).

В технологическом отношении исключительно важным органом растений являются корни. Они выделяют экссудаты и впитывают в себя токсичные соединения. Благодаря ферментам корневых экссудатов (в ризосфере) и внутриклеточным ферментам корневой системы осуществляются первые этапы трансформации токсичных соединений, содержащихся в почве и воде. Поэтому тип корней, их разветвленность и охватываемый ими объем почвы – важнейшие факторы для успешной реализации фиторемедиационных технологий (Квеситадзе с соавт., 2005). У всех отобранных нами растений была развитая корневая система, наибольший объем почвы занимали корни ячменя и газонной травы, которая также имела значительную надземную биомассу.

Таким образом, были составлены растительно-микробные ассоциации «ВиО» - ячмень и «ВиО» - газонная трава. Дальнейшие эксперименты проводили с целью оценки эффективности составленных консорциумов в отношении почв, загрязненных нефтью. Однако в связи с тем, что стоимость газонной травы выше по сравнению с ячменем, в лабораторных экспериментах использовали микробно-растительную ассоциацию «ВиО» - ячмень.

Оценку эффективности деградации нефти растительно-микробными ассоциациями проводили в стерильных модельных почвенных системах при использовании ассоциации растений (ячменя) с каждым из штаммов (*Rhodococcus erythropolis* S26, *Acinetobacter baumannii* 1б, *Acinetobacter baumannii* 7 и *Pseudomonas putida* F701), входящих в консорциум «ВиО», а также ячменя и целого консорциума «ВиО» (т.е. всех 4 штаммов одновременно).

Как видно из данных Рис. 80, нефть оказывала значительный токсический эффект на растения: дина побегов ячменя при добавлении в почву нефти была почти в 4 раза меньше, чем контрольных растений, выращенных без нефти. Внесение микроорганизмов в модельные системы, загрязненные нефтью и засеянные растениями способствовало детоксикации почвы, что выражалось в увеличении

длины побегов по сравнению с отрицательным контролем (растения + нефть без микроорганизмов). А в модельных системах с консорциумом «ВиО», штаммами *Rhodococcus erythropolis* S26 и *Acinetobacter baumannii* 7 длина побегов ячменя была сравнима с контрольными растениями без нефти. Возможно, это связано с деградацией поллютанта интродуцированными бактериями и их способностью колонизировать корни растений и ризосферу, что приводило к снижению токсического эффекта нефти.

Численность штаммов на корнях (Рис. 81) была выше на 1-2 порядка, чем в ризосфере (Рис. 82), это связано с потреблением бактериями питательных веществ, содержащихся в корневых экссудатах. Ранее было показано, что при совместном культивировании штаммов родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas* численность родококков снижалась более чем на порядок, при одновременном увеличении численности псевдомонад (Барышникова с соавт., 2001). В нашей работе анализ численности каждого из штаммов при совместной инокуляции в составе микробно-растительной ассоциации «ВиО» - ячмень показал, что не происходит существенных изменений в концентрации микроорганизмов, по сравнению с раздельной интродукцией каждого штамма. Это может свидетельствовать об отсутствии негативных взаимодействий, таких как конкуренция.

Сравнение степени деструкции нефти в модельных системах через 10 суток эксперимента (Рис. 83) показывает, что наибольшая убыль нефти наблюдалась при использовании ассоциации «ВиО» с растениями – 19% . При использовании растительно-микробных ассоциаций *Rhodococcus erythropolis* S26 - ячмень, *Acinetobacter baumannii* 1B - ячмень, *Acinetobacter baumannii* 7 - ячмень, *Pseudomonas putida* F701 степень деструкции нефти была около 10%. Возможно, в процессе биодеградации нефти ассоциацией микроорганизмов «ВиО» между бактериями возникала кооперация, в результате которой процесс утилизации углеводородов нефти проходил более эффективно. Следует отметить, что растения вносили непосредственный вклад в снижение концентрации нефти в почве (7%), за счет своих собственных ферментных систем и механизмов детоксикации поллютантов. Ранее отмечалось (Naumann et al. 1991), что взаимодействие корней растений с органическими соединениями (в том числе и углеводородами нефти) индуцирует пероксидазную активность, которая может иметь внутриклеточную функцию как часть защитного механизма и/или прямо влиять на деградацию поллютантов в окружающей среде.

Таким образом, консорциум «ВиО», ассоциированный с растениями (в

частности, с ячменём) является перспективным инструментом для ремедиации нефтезагрязненных почв.

4.14 Оценка эффективности деградации нефти в нестерильных модельных почвенных системах, содержащих растительно-микробные ассоциации

Оценку эффективности деградации нефти растительно-микробной ассоциацией «ВиО»-ячмень проводили в нестерильных лабораторных модельных почвенных системах с внесением минеральных удобрений (нитроаммофоски) и без них (схема эксперимента приведена в Табл. 42).

Анализ полученных данных показал, что внесение ассоциации «ВиО» не влияло на длину побегов ячменя в модельных системах без нефти, а интродукция микроорганизмов ассоциации «ВиО» в почву, загрязнённую нефтью, снижала токсическое влияние поллютанта и увеличивало длину побегов (Рис. 84). Следовательно, хотя бактерии, входящие в ассоциацию «ВиО» не обладают свойствами PGPR – штаммов, они повышают биометрические показатели растений за счёт деградации загрязнителя.

Численность всех интродуцированных штаммов ассоциации «ВиО» (Рис.85) поддерживалась на достаточно высоком уровне, как в ризосфере (10^6 КОЕ /г почвы), так и на корнях растений (10^7 - 10^8 КОЕ /г корня) (Рис.39). Внесение удобрений не повлияло на изменение численности микроорганизмов в составе растительно-микробной ассоциации «ВиО». Как известно, минеральные вещества (удобрения), вносимые в почву повышают интенсивность и эффективность физиологических процессов микроорганизмов, в том числе и процесса биодеградации загрязнителей (Биккинина с соавт., 2006). Как видно из полученных в ходе работы данных это явление не обязательно сопровождается увеличением численности микроорганизмов в почве, как это было показано ранее (Нечаева И.А. с соавт.,2008). Таким образом, минеральные удобрения стимулируют активность микрофлоры почвы, но не обязательно влияют на численность интродуцированных бактерий. При этом было отмечено ярко выраженное влияние внесения минеральных удобрений на эффективность деградации загрязнителя (Рис. 86) растительно-микробной ассоциацией «ВиО»-ячмень: степень деструкции нефти возрастала в 3 раза.

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

С целью оценки эффективности отселектированой растительно-микробной ассоциации («ВиО»-ячмень) были проведены сравнительные полевые испытания на территории нефтяных месторождений Ямало-Ненецкого автономного округа. Испытания проводили в течение 2 месяцев. Эффективность деградации нефти при обработке сайта ассоциацией «ВиО» оценивалась в сравнении с эффективностью деградации биопрепаратами «Биоойл-СН» и «Биоойл-Югра». Проводили анализ промежуточных (через 1 месяц) и конечных результатов (через 2 месяца). В летний период почва прогревалась до 10°С при среднесуточной температуре воздуха от -2 до + 24°С.

Наилучший защитный эффект на побеги ячменя оказывали микроорганизмы, входящие в состав ассоциации «ВиО» и биопрепарата «Биоойл-Югра» (Рис. 87). Так как ранее было отмечено, что бактерии консорциума «ВиО» (Рис.84), по-видимому, не обладают активностью PGPR-штаммов, можно предположить, что полученный защитный эффект был результатом снижения концентрации углеводородов нефти, а следовательно и токсичности загрязнителя. 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. 91).

Численность микроорганизмов ассоциации «ВиО» на корнях растений (Рис. 88) была приблизительно одинакова для всех штаммов (10^7 КОЕ/г корня), а непосредственно в почве (Рис. 89) штаммы S26 и 1б оказались менее конкурентоспособными по сравнению со штаммами F701 и 7. Как было показано, штамм 1б имеет более низкую скорость хемотаксической реакции в отношении нефтепродуктов по сравнению с тремя другими штаммами консорциума «ВиО», причем при понижении температуры этот показатель также снижается, что, возможно, повлияло на численность бактерий в почве.

Таким образом, при проведении полевых испытаний показана эффективность биоремедиации *in situ* с использованием микробно-растительной ассоциации «ВиО»-ячмень в условиях реального разлива нефти и резкого изменения температуры окружающей среды. Получены заключения об эффективности ассоциации «ВиО» от ОАО «Газпромнефть – Ноябрьскнефтегаз», ООО «Газпромнефть-Восток», «Сибнефть-Восток», ЗАО «Биоойл» (см. Приложения).

Полученные результаты по изучению взаимодействия микроорганизмов-деструкторов в ризосфере и ризоплане растений в присутствии углеводородов нефти в модельных почвенных системах и полевых экспериментах создают предпосылки для дальнейших более детальных исследований особенностей и механизмов взаимоотношений между бактериями и растениями в процессе биодеградации углеводородов нефти.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований **разработаны научные идеи** об использовании психротрофных галотолерантных микроорганизмов-нефтедеструкторов, продуцирующих биоПАВ, для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений в условиях низких положительных температур, а также о возможности использования катаболических плазмид для повышения эффективности биодеградации углеводородов нефти.

Выработаны критерии отбора штаммов-нефтедеструкторов для разработки новых более эффективных биопрепаратов для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений. Комбинация всех перечисленных ниже свойств, наиболее важных для эффективной деградации углеводородов нефти, до сих пор не была описана ни для одного из известных биопрепаратов:

— способность к деградации высоких концентраций нефти или нефтепродуктов (до 30%) в широком диапазоне температур (от 4 до 42°C);

— способность к деградации углеводородов при различных значениях pH (4–10);

— галотолерантность (до 5% NaCl);

— наличие катаболических плазмид;

— продуцирование эффективных биоПАВ;

— способность к колонизации корней растений;

— совместимость микроорганизмов в составе ассоциации.

Предложены способы получения и применения биопрепарата для очистки от нефтяных загрязнений, а так же способ получения сухой формы биопрепарата с использованием контактной сушки и способ активации сухой формы биопрепарата. На все эти разработки получены патенты РФ.

Доказано, что биотехнологическое применение плазмид биодеградации различных ароматических углеводородов повышает эффективность микробной деструкции углеводородов нефти. Получено прямое доказательство, что в открытой окружающей среде в почве как в присутствии загрязнителя (нафталина), так и без него происходит горизонтальный перенос меченой плазмиды биодеградации нафталина из

интродуцированного штамма в почвенные бактерии рода *Pseudomonas*. Выделены и охарактеризованы новые плазмиды биодеградации ПАУ pAP4, pAP5, pAP35, pAP36, pBS3950.

Введены новые представления об эффективности биопрепаратов на основе психротрофных галотолерантных микроорганизмов-нефтедеструкторов, продуцирующих биоПАВ для использования в технологиях биоремедиации в условиях холодного климата. Впервые оценен вклад катаболических плазмид в биодеградацию различных фракций нефти в почве и в жидкой минеральной среде.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что в развитие научной идеи А.М. Боронина о возможности применения плазмид в экологической биотехнологии разработаны научные основы и **концепция** выбора штаммов-нефтедеструкторов для составления микробных ассоциаций как основы биопрепаратов для биоремедиации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами в условиях умеренного и холодного климата. Углеводородокисляющие микроорганизмы в составе ассоциации должны быть совместимы, способны к деградации высоких концентраций нефти (до 30%) в широком температурном диапазоне (от 4 до 42°С), 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.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс современных микробиологических, генетических, молекулярно-биологических, физико-химических и биотехнологических методов.

Изложены данные о физиолого-биохимических и метаболических характеристиках и особенностях наиболее эффективных психротрофных штаммов-деструкторов углеводородов нефти, обладающих способностью к деградации высоких концентраций нефти и нефтепродуктов в присутствии соли в широком температурном и pH диапазонах; а также образующих биоэмульгаторы.

Раскрыты особенности и показана возможность глубинного периодического культивирования психротрофных микроорганизмов-нефтедеструкторов родов

Pseudomonas и *Rhodococcus* в смешанной культуре с высоким выходом биомассы (с численностью родококков $3{,}8\times10^{10}$ КОЕ/г и псевдомонад – $3{,}4\times10^{10}$ КОЕ/г концентрированной суспензии), что было использовано в технологии получения биопрепарата «МикроБак».

Изучены поверхностно-активные свойства наиболее активных штаммов-нефтедеструкторов, продуцирующих биоПАВ. 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 сукциноилтрегалолипиды.

Значение полученных результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

- создана коллекция, содержащая более 200 штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов. Детально охарактеризованы наиболее эффективные психротрофные штаммы-нефтедеструкторы, обладающих способностью к деградации высоких концентраций нефти и нефтепродуктов (до 30%) в присутствии соли (до 5% NaCl) в широком температурном диапазоне (4-42˚С) при значениях pH от 4 до 10, а также образующие биоэмульгаторы. Отобранные штаммы принадлежат к родам *Rhodococcus, Pseudomonas, Acinetobacter, Micrococcus* и *Serratia*;
- разработанный способ высушивания биомассы с использованием защитной среды и контактной сушки позволяет сохранить деградативную активность микроорганизмов и повысить их выживаемость в сухом препарате в 1,5–2 раза по сравнению с лиофилизацией;
- разработан, испытан и запатентован биопрепарат «МикроБак» (Pseudomonas spp., Rhodococcus spp.) для очистки почвогрунтов от нефтяных загрязнений в условиях холодного и умеренного климата. Разработан и испытан консорциум (опытный образец биопрепарата) «ВиО» (*Pseudomonas* sp.,

Rhodococcus sp., *Acinetobacter* spp.) для эффективной деградации высоких концентраций нефти (до 30%) в широком диапазоне температур (4–42ºС) при значениях pH от 4 до 10;

- лабораторные испытания опытных образцов биопрепаратов «МикроБак» и «ВиО» в жидкой минеральной среде и в модельных почвенных системах, загрязненных нефтью или дизельным топливом, показали их большую эффективность по сравнению с коммерческими биопрепаратами ЗАО «Биоойл», одними из наиболее востребованными на рынке РФ, в том числе и при низкой температуре. Полевые испытания биопрепарата «МикроБак» при пониженной температуре показали, что за 2 месяца он способен утилизировать от 50 до 90% нефти и нефтепродуктов в зависимости от условий;
- 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;
- разработаны и испытаны растительно-микробные ассоциации «ВиО» — ячмень и «ВиО» — газонная трава. В полевых испытаниях на территории нефтяных месторождений Ямало-Ненецкого автономного округа за 2 месяца при колебаниях температуры воздуха от -2 до +24°С наибольшая эффективность деградации нефти наблюдалась на участке, обработанном ассоциацией «ВиО» — ячмень (89%) по сравнению с ассоциациями биопрепаратов ЗАО «Биоойл» с ячменем (70-75%);
- получены 5 патентов РФ на штамм микроорганизмов, ассоциацию микроорганизмов-нефтедеструкторов, биопрепарат для очистки от нефтяных загрязнений, способ его получения и применения, а так же на способ

получения сухой формы биопрепарата и способ активации сухой формы биопрепарата.

Разработан метод мониторинга интродуцированных в окружающую среду штаммов-нефтедеструкторов с использованием культурально-морфологических признаков, маркеров антибиотикорезистентности и метода геномных фингерпринтов. Впервые с применением разработанного метода мониторинга удалось проследить за судьбой интродуцированных микроорганизмов-деструкторов нефти в открытой окружающей среде и показать их конкурентоспособность.

Определены условия и режимы культивирования штаммов-нефтедеструкторов, обеспечивающие выход биомассы с высокой численностью живых клеток.

Представлена возможность подготовки биомассы штаммов-нефтедеструкторов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* к длительному хранению с использованием защитной среды и контактной сушки, обеспечивающие высокую жизнеспособность и деградативную активность микроорганизмов.

Достоверность результатов исследования подтверждается тем, что результаты получены на сертифицированном оборудовании; показана воспроизводимость результатов исследования; изученные и охарактеризованные штаммы-нефтедеструкторы *Rhodococcus* sp. X5, *Rhodococcus* sp. S67, *Pseudomonas* sp. 142NF(pNF142), *Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142) депонированы во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов, а штаммы *Acinetobacter baumannii* 1B, *Acinetobacter baumannii* 7, *Rhodococcus erythropolis* S26, *Pseudomonas putida* F701 – в коллекцию культур микроорганизмов Научно-исследовательского института Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» с присвоением регистрационных номеров.

Материалы диссертации полностью изложены в опубликованных работах.

Использованы современные микробиологические, генетические, молекулярно-биологические, физико-химические и биотехнологические методы, а также компьютерные методы обработки данных.

Личный вклад соискателя:

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 7 магистерских и 5 кандидатских диссертаций. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях в списке литературы (с. 353-359).

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˚С) 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 биодеградации ароматических углеводородов в повышение степени микробной деструкции углеводородов нефти. Выделены и охарактеризованы новые плазмиды биодеградации 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 биодеградации 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 $3{,}8\times10^{10}$ КОЕ/г и псевдомонад – $3{,}4\times10^{10}$ 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 (4–42ºС) при значениях pH 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°С) 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°С была на 20% более эффективной, чем ассоциацией ячменя с другими коммерческими биопрепаратами.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА 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. Грищенков 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 углеводородов // **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 биодеградации 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 углеводородов, выделенные из почв донных отложений района солеразработок // **Микробиология**. 2001. Т. 70. № 1. С. 51–58.

12. Filonov A.E, Puntus I.F., Karpov A. V., Kosheleva I.A., Kashparov K.I., Slepenkin 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 биодеградации 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 биодеградации 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 биодеградации 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. Биодеградация нефти психротрофными микроорганизмами-деструкторами и её адсорбция растительным сорбентом в жидкой минеральной среде // **Биотехнология.** 2007. № 2. С. 31–39.

27. А.А. Ветрова, А.А. Игнатова, А. Е. Филонов, И.Ф. Пунтус, А. М. Боронин. Деструкция нефти бактериями рода *Pseudomonas*, содержащими различные плазмиды биодеградации // **Известия Тульского государственного университета**. Естественные науки. 2008. Вып. 2. С. 186–193.

28. Петриков К.В., Власова Е.П., Понаморева 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. А.Е. Филонов, К.В. Петриков, Т.В. Якшина, И.Ф. Пунтус, Е.П. Власова, И.А. Нечаева, В.А. Самойленко. Режимы раздельного и совместного культивирования микроорганизмов-деструкторов нефти родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus* // **Биотехнология**. 2008. № 6. С. 80–85.

30. А.А.Овчинникова, А.А.Ветрова, А.Е.Филонов, А.М.Боронин. 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. И.Ф. Пунтус, А.Е. Филонов, Л.И. Ахметов, А.В. Карпов, А.М. Боронин. Деградация фенантрена бактериями родов *Pseudomonas* и *Burkholderia* в модельной почве // **Микробиология**. 2008. Т. 77. № 1. С. 11–20.

32. Л.И. Ахметов, А.Е. Филонов, И.Ф. Пунтус, И.А. Кошелева, И.А. Нечаева, Д. Йонге, Дж. Петерсен, А.М. Боронин. Горизонтальный перенос катаболических плазмид в процессе биодеградации нафталина в модельной почве. // **Микробиология,** 2008, Т. 77. №1. С. 29–39.

33. А.А. Овчинникова, А.А. Ветрова, А.Е. Филонов, А.М. Боронин. Биодеградация фенантрена и взаимодействие *Pseudomonas putida* BS3701 и *Burkholderia* sp. BS3702 в ризосфере растений // **Микробиология**. 2009. Т. 78. № 4. С. 484–490.

34. А.А. Ветрова, А.А. Овчинникова, И.Ф. Пунтус, А. Е. Филонов, А. М. Боронин. Интенсификация биодеградации нефти плазмидосодержащими штаммами *Pseudomonas* в модельных почвенных системах // **Биотехнология**. 2009. № 4. С. 82–90.

35. И.А. Нечаева, А.Е. Филонов, Л.И. Ахметов, И.Ф. Пунтус, А.М. Боронин. 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. А.Е. Филонов, Л.И. Ахметов, И.Ф. Пунтус, Т.З. Есикова, А.Б. Гафаров, И.А. Кошелева, А.М. Боронин. Горизонтальный перенос катаболических плазмид и биодеградация нафталина в открытой почве // **Микробиология**. 2010. Т. 79. № 2. С. 206–212.

37. К.В. Петриков, Е.П. Власова, А.А. Ветрова, А.А. Овчинникова, О.Н. Понаморёва , В.А. Алфёров, И.Ф. Пунтус, А.Е. Филонов. 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.V., Delegan Ya.D., Surin A., Ponamoreva O.N., Puntus I.F., Filonov A.E., Boronin A.M. 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. А.А. Ветрова, А.А. Иванова, А. Е. Филонов, В.А. Забелин, И.А. Нечаева, Ле Тхи Бич Нгует, А. М. Боронин. 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. А.А. Ветрова, А.А. Иванова, А. Е. Филонов, В.А. Забелин, А.Б. Гафаров, С.Л. Соколов, И.А. Нечаева, И. Ф. Пунтус, А. М. Боронин. 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 [13c]/[12c] отношений для характеристики микробных продуктов при биодеградации 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. Биодеградация 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. A.M. Boronin, A.E. Filonov, I.A. Kosheleva, A.N. Shkidchenko, A.B. Gafarov, S.L. Sokolov, I.F. Puntus, V.G. Grishchenkov, V.V. Dmitriev, M.U. Arinbasarov. 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. A. Filonov, A. Ovchinnikova, A. Vetrova, I. Nechaeva, K. Petrikov, E. Vlasova, L. Akhmetov, I. Puntus, A. Shestopalov, V. Zabelin, A. Boronin. 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. Опубл. 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. Опубл. 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. Опубл. 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. Опубл. 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. Опубл. 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. И.Ф. Пунтус, Л.И. Ахметов, А.Е. Филонов, И.А. Нечаева, Т.В. Рогова. Учебно-методическое пособие по курсу «Генетические методы биотехнологии защиты окружающей среды» / Тула: Издательство ТулГУ, 2008. 113 с.

57. A. Filonov., I. Nechaeva., Vetrova A., A. Ovchinnikova., A. Gafarov., I. Puntus., L. Akhmetov. 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.

Литература

1. Абрамзон А.А. Поверхностно-активные вещества. Свойства и применение. Л.: «Химия», 1975. 248 с.
2. Авчиева П.Б. Консорциум дрожжей *Candida maltosa* для биодеградации нефтезагрязнений // Патент РФ 2114174, 1997.
3. Алексеева Т.П., Бурмистрова Т.И., Терещенко Н.Н., Стахина Л.Д., Панова И.И. Перспективы использования торфа для очистки нефтезагрязненных почв // Биотехнология. 2000. № 1. С. 58-64.
4. Алехин В.Г., Емцев В.Т., Рогозина Е.А., Фахрутдинов А.И. Биологическая активность и микробиологическая рекультивация почв, загрязненных нефтепродуктами // Биологические ресурсы и природопользование. Сб. науч. трудов. Нижневартовск: Изд-во Нижневарт. пед. ин-та. 1998. С. 95-105.
5. Андресон Р.К., Хазиев Ф.Х., Дешура В.С., Багаутдинов Ф.Я., Бойко Т.Ф., Новоселова Е.И. Способ рекультивации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами // Патент РФ 2077397, 1992.
6. Анохина Т.О., Кочетков В.В., Зеленкова Н.Ф., Балакшина В.В., Боронин А.М. Биодеградация фенантрена ризосферными плазмидосодержащими бактериями рода *Pseudomonas* в растительно-микробных ассоциациях // Прикл. Биохим. Микробиол. 2004. Т. 40. № 6. С. 654-658.
7. Арчегова И.Б., Евдокимова Т.В., Котелина Н.С., Кузнецова Е.Г., Маркарова М.Ю., Полшведкин В.В., Турубанова Л.П. Рекомендации по рекультивации земель на Крайнем Севере / Рекультивация земель на Севере. 1997. Вып. 1. С. 34.
8. Аушева Х.А. Разработка новой формы биопрепарата для очистки водных объектов от тонких нефтяных пленок: Автореферат дис. ... канд. техн. наук. М., 2007. 21 с.
9. Ахметов Л.И. Роль горизонтального переноса плазмид биодеградации в микробной деструкции полициклических ароматических углеводородов: Дис. ... канд. биол. наук. Пущино, 2006. 163 с.
10. Ахметов Л.И., Иванова Е.С., Пунтус И.Ф., Есикова Т.З., Филонов А.Е., Шкидченко А.Н., Боронин А.М. Горизонтальный перенос плазмиды биодеградации нафталина в процессе микробной деструкции дизельного топлива и нефти в открытом проточном биореакторе // Биотехнология. 2006. № 4. С. 79-86.
11. Бакулин М.К., Дармов И.В., Чеботарев Е.В., Кучеренко А.С., Бакулина Л.В., Кривошеина Н.А. Влияние перфторорганических соединений на рост и развитие бактерий и микромицетов // Сборник материалов XIII Международной конференции. Пущино – 2004 – С. 186-198.

12. 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. С. 488-493.

13. Барышникова Л.М. Грищенков В.Г., Аринбасаров М.У., Шкидченко А.Н., Боронин А.М. Биодеградация нефтепродуктов штаммами-деструкторами и их ассоциациями в жидкой среде // Прикл. Биохим. Микробиол. 2001. Т.37. С.542-548

14. Белонин М.Д., Рогозина Е.А., Свечина Р.М., Хотянович А.В., Орлова Н.А. Биопрепарат для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов// Патент РФ 2053205, 1996.

15. Белоусова Н.И., Барышникова Л.М., Шкидченко А.Н. Отбор микроорганизмов, способных к деструкции нефти и нефтепродуктов при пониженных температурах // Прикл. Биохим. Микробиол. 2002. Т.38. № 5. С. 513-517.

16. Биккинина А.Г., Логинов О.Н., Силищев Н.Н., Бакаева М.Д., Галимзянова Н.Ф., Бойко Т.Ф. Повышение эффективности процесса биоремедиации отработанной отбеливающей земли, загрязненной углеводородами, при совместном использовании комплекса биопрепаратов Ленойл и Азолен // Биотехнология.2006, №5, с. 57-62.

17. Биохимия мембран: Учеб. пособие для биол. и мед. спец. вузов. В 5 кн. / Под ред. А.А. Болдырева. Кн. 3: Замораживание и криопротекция / А.М. Белоус, Е.М. Гордиенко, Л.Ф. Розанов. М.: Высш. шк., 1987. 80 с.

18. Борзенков И.А., Милехина Е.И., Беляев С.С., Иванов М.В. Консорциум микроорганизмов *Rhodococcus maris, Rhodococcus* sp., *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas stutzeri, Candida* sp., используемый для очистки почвенных и солоноватоводных экосистем от загрязнений нефтепродуктами // Патент РФ 2023686, 1994.

19. Борзенков с соавт. Патент 2114071 РФ. Способ очистки почвы, природных и сточных вод, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, с использованием биопрепаратов. / Борзенков И.А., Беляев С.С., Ибатуллин Р.Р., Поспелов М.Е., Свитнев А.И. Опубл. 1998.06.27. Бюл. №18.

20. Борисоглебская А.Н., Боронин А.М. Популяционные изменения штамма *Pseudomonas putida* BSA202, содержащего плазмиду NPL-1, по способности к катаболизму нафталина // Микробиология. 1983. №52. С. 301.

21. Бородавкин П.П. Охрана окружающей среды при строительстве и эксплуатации магистральных трубопроводов. М.: Недра, 1981. 308 с.

22. Боронин А.М., Пориц А.Л., Скрябин Г.К. Штамм *Pseudomonas aeruginosa* 123, несущий ОСТ+, САМ+, NAH+ плазмиды, используемый при биологической очистке воды от нефти и нефтепродуктов. Авторское свидетельство об изобретении СССР № 612958. Приоритет от 01. 12. 76.

23. Боронин А.М. Биология плазмид // Успехи микробиологии. 1983. Вып. 18. С.143-163.

24. Брезгунов В.Н., Завольский Л.Ю., Лазарев А.В., Попов В.Г. Хемотаксис бактерий. // Усп. микробиологии. 1989. № 23. С. 3-27.

25. Брода П. Плазмиды: Пер.с англ. М.: Мир, 1982. 224 с.

26. Бузмаков С.А., Ладыгин И.В. Влияние нефтепромыслов на растительный и животный мир Камского Предуралья: Тез. докл. межгос. научн. конф. (Пермь, май 1993). Пермь: 1993. Ч. 1. С. 201-205.

27. Вельков В.В. Биоремедиация: принципы, проблемы, подходы // Биотехнология. 1995. № 3-4. С. 20-27.

28. Волкова О.В., Анохина Т.О., Пунтус И.Ф., Кочетков В.В., Филонов А.Е., Воронин А.М. Влияние плазмид биодеградации нафталина на физиологические характеристики ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* // Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 5. С. 525-529.

29. Габбасова И.М., Сулейманов Р.Р., Хазиев Ф.Х., Бойко Т.Ф., Галимзянова Н.Ф., Фердман В.М., Ханисламова Г.М. Рекультивация серой лесной почвы, загрязненной нефтяным шламом // Нефтяное хозяйство. 2001. №7. С.81-84

30. Гайнутдинов М.З., Самосова С.М., Артемьева Т.И., Гилязов М.Ю., Храмов И.Т., Гайсин И.А., Фильченкова В.И., Жеребцова А.К. Рекультивация нефтезагрязненных земель лесостепной зоны Татарии // Восстановление нефтезагрязнённых почвенных экосистем. М.: Наука, 1988. С. 177-197.

31. Головлёв Е.Л. Экологическая стратегия бактерий: специфика проблемы // Микробиология. 2001. Т. 70. № 4. с. 437-443.

32. Прозоров А.А. Горизонтальный перенос генов у бактерий: лабораторное моделирование, природные популяции, данные геномики. Микробиология. 1999, т.68, №5, с. 632-646.

33. ГОСТ Р 8.563-96 «Массовая концентрация нефтепродуктов в водах. Методика выполнения измерений ИК-фотометрическим методом»

34. Градова Н.Б., Гориова И.Б., Эддауди Р., Салина Р.Н. Использование бактерий рода *Azotobacter* при биоремедиации нефтезагрязненных почв // Прикл. биохим. и микробиол. 2003. Т. 39. №3. С. 318-321.

35. Грищенков 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. № 4. Т.33, С. 423-427.

36. Дербышев с соавт. Патент 2111246 РФ. Способ получения биомассы аэробнорастущих микроорганизмов / Дербышев В.В., Глухов Н.Н., Клыков С.П., Набокова А.П., Щербаков Г.Я. Опубл. 20.05.1998. Бюл. №14.

37. Дмитриев В.В., Файзутдинова Р.Н., Офицеров Е.Н., Фихте Б.А. Реиммобилизация чужеродных гидролаз у дрожжей в смешанных популяциях // Микробиология. 1993. Т.62. Вып. 5. С. 944-949.

38. Долинов К.Е. Основы технологии сухих биопрепаратов. М.: Изд-во «Медицина», 1969. 232 с.

39. Другов Ю.С., Родин А.А. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов // Практическое руководство. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. 270 с.

40. Ермоленко З.М., Холоденко В.П., Чугунов В.А. Биологические характеристики штамма микобактерий, выделенного из нефти Ухтинского месторождения // Микробиология. 1997, Т.66. №5. С. 650-654.

41. Жолобов В.Л., Новохватко Т.Н., Шумская Г.И.//Тез.докл. конф. «Проблемы, способы и средства защиты окружающей срды от загрязнений нефтью и нефтепродуктами». М., 1995, с.73-74.

42. Звягинцев Д.Г., Гузеев С.А., Левин С. В. Диагностические признаки различных уровней загрязнений почвы нефтью // Почвоведение. 1998. Т. 1. С 72-78.

43. Звягинцева И.С., Поглазова М.Н., Готоева М.Т., Беляев С.С. Влияние солёности среды на деструкцию нефтяных масел нокардиоподобными бактериями // Прикл. биохим. и микробиол. 2001б. Т. 70. № 6. С. 759-764.

44. Зеленкова Н.Ф, Аринбасаров М.У. Анализ продуктов микробиологической деградации толуола методом обращено-фазной жидкостной хроматографии // Прикл. биохим. и микробиол. 2003. Т. 39. № 2. С. 199-201.

45. Измалкова Т.Ю. Разнообразие генетических систем катаболизма нафталина штаммов флуоресцирующих псевдомонад: Дис. ... канд. биол. наук. Пущино, 2004. 129 с.

46. Изъюрова А.И. Скорость распада нефтепродуктов в воде и почве // Гигиена и санитария. 1950. № 9. С. 9-15.

47. Исмаилов Н.М. Микробиология и ферментативная активность нефтезагрязненных почв // Восст. нефтезагр. почв. экос. М.: Наука, 1988. С. 42-57.

48. Ихсанов В.Б., Ихсанова Н.А. Способ обработки призабойной зоны нефтедобывающей скважины // Патент РФ 2156353, 2000.

49. Калюжный С.В. Биотехнология защиты окружающей среды: единство биокаталитических и инженерных подходов // Изв. АН. Серия химическая. 2001. № 10. С. 1735-1742.

50. Карасёва Э.В., Карасёв С.Г., Самкова С.М., Гора В.В., Волченко Н.Н., Самков А.А., Головина И.Е. Микробиологический подход к реабилитации экосистем, загрязнённых нефтепродуктами и отходами бурения при проведении буровых работ на морском шельфе // Наука Кубани. 2008. № 1. С. 14-19.

51. Карасёва Э.В., Самков А.А., Волченко Н.Н., Карасёв С.Г., Худокормов А.А. Способ микробиологической очистки нефтяных шламов и загрязнённого нефтепродуктами грунта (варианты). Патент РФ 2311237, 2006.

52. Карасёва Э.В., Самков А.А., Карасёв С.Г., Сычёв В.Ю. Препарат для микробиологической очистки нефтяных шламов и загрязнённого нефтепродуктами грунта // Патент РФ № 2317162, 2006.

53. Кацы Е.И. Генетико-биохимические и экологические аспекты подвижности и хемотаксиса у фитопатогенных, симбиотических и ассоциированных с растениями бактерий. // Усп. соврем. биол. 1996. Т. 116. Вып. 5. С. 579-593.

54. Кацы Е.И. Молекулярная генетика ассоциа-тивного взаимодействия бактерий и растений. М.: Наука, 2007. 86 с.

55. Квасников Е.И., Ключникова Т.М. Микроорганизмы-деструкторы нефти в водных бассейнах. Киев: Наукова думка. 1981. 165 с.

56. Киреева Н.А. Микробиологические процессы в нефтезагрязненных почвах: Автореф. дисс. д-ра биол. наук. СПб, 1996. – 25 с.

57. Киреева Н.А. Микробиологические процессы в нефтезагрязненных почвах. Уфа: Изд-во БашГУ, 1996. 172 с.

58. Киреева Н.А., Водопьянов В.В., Григориади А.С., Новоселова Е.И., Багаутдинова Г.Г., Гареева А.Р., Лобастова Е.Ю. Эффективность применения биопрепаратов для восстановления техногенно-загрязнённых почв // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2010. Т.12. №1(4). С.1023-1026.

59. Кириллова Н.П., Кожевин П.А., Звягинцев Д.Г. Динамика накопления клубеньковых бактерий на корнях проростков гороха. // Микробиология. 1984. Т. 53. Вып. 1. С. 117-122.

60. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. Т. 1. М.: Мир. 1981. – 606 с.

61. Кобзев Е.Н. Биодеструкция нефти и нефтепродуктов микробными ассоциациями в модельных системах. Дис. … канд. биол. наук. 2003. Оболенск. 179 с.

62. Кобзев Е.Н., С.Б. Петрикевич, А.Н. Шкидченко. Исследование устойчивости ассоциации микроорганизмов - нефтедеструкторов в открытой системе // Прикл. биохим. микробиол. 2001. Т.37. №4. С. 413-417.

63. Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Чуенко Т.В., Ившина И.Б., Куюкина М.С., Рычкова М.И., Филп Дж.К. Углеродсодержащие макроструктурированные керамические носители для адсорбционной иммобилизации ферментов и микроорганизмов // Биотехнология. 2006. №1. С. 67-77.

64. Кожанова Г.А. Способ получения бактериального препарата для очистки водной среды от загрязнений нефтепродуктами // Патент РФ 2033975, 1991.

65. Коломынцева М.П., Соляникова И.П., Головлев Е.Л., Головлева Л.А. Гетерогенность *Rhodococcus opacus* 1CP как ответ на стрессовое воздействие хлорфенолов // Микробиология. 2005. Т. 41. №5. С. 541-546.

66. Коронелли Т.В. 1984. Липиды микобактерий и родственных микроорганизмов. М.: Изд-во МГУ. 413 с.

67. Коронелли Т.В. Микробиологическая деградация углеводородов и ее экологические последствия // Биологические науки. 1982. №3. С. 5-12.

68. Коронелли Т.В. Поступление углеводородов в клетки микроорганизмов // Успехи микробиологии. 1980. Вып. 15. С. 99-111.

69. Коронелли Т.В., Комарова Т.И., Игнатченко А.В. Взаимодействие бактерий в культуре, содержащей Pseudomonas и Mycobacterium, в связи с окислением углеводородов // Микробиология. – 1984 – Т. 53. – Вып. 2. – С. 213-217

70. Коронелли Т.В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводородов в окружающей среде // Прикл. биохим. и микробиол. 1996. Т. 32. № 6. С. 579 – 585.

71. Коронелли Т.В., Дермичева С.Г., Ильинский В.В., Комарова Т.И., Поршнева О.В. Видовая структура углеводородокисляющих бактериоценозов водных экосистем разных климатических зон // Микробиология. 1994. Т. 63. Вып. 5. С 917-923.

72. Коронелли Т.В., Дермичева С.Г., Коротаева Е.В. Выживаемость углеводородокисляющих бактерий в условиях полного голодания // Микробиология. 1988. Т. 57. № 2. С. 298-302.

73. Кочетков В.В., Балакшина В.В., Мордухова Е.А., Боронин А.М. Плазмиды, кодирующие биодеградацию нафталина в ризосферных бактериях рода *Pseudomonas* // Микробиология. 1997. Т. 66. № 2. С. 211-216.

74. Кочетков В.В. Плазмиды биодеградации нафталина у бактерий рода *Pseudomonas* // Дисс. … канд. биол. наук. – Пущино, 1985.

75. Кочетков В.В., Старовойтов И.И., Боронин А.М., Скрябин Г.К. Плазмида pBS241 *Pseudomonas putida,* контролирующая деградацию бифенила. // Докл. АН СССР. 1985.

76. Кошелева И.А., Есикова Т.З., Федотова Т.В., Чубарова Е.В., Филонов А.Е., Боронин А.М. Влияние загрязнения почвы на распространение плазмид биодеградации в присутствии растений. Материалы международной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии», 1-2 июня 2006, Минск-Раков, с. 49-51.

77. Кошелева И.А., Цой Т.В., Ивашина Т.В., Селифонов С.А.. Старовойтов И.И., Боронин А.М. Мутации плазмиды pBS286, блокирующие первичные этапы окисления нафталина, индуцированные Tn5 // Генетика. 1988. № 24. С. 396.

78. Кошелева И.А., Цой Т.В., Кулакова А.Н., Боронин А.М. Сравнительный анализ организации плазмиды NPL-1, контролирующей окисление нафталина клетками *Pseudomonas putida*, и ее производных // Генетика. 1986. Т. 22. № 10. С. 2389-2397.

79. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под ред. А.А. Цуцаевой. Киев: Наукова думка, 1983. – 240 с.

80. Кузнецов А.Е., Градова Н.Б., Лушников С.В., Энгельхарт М., Вайссер Т., Чеботаева М.В. Прикладная экобиотехнология. Учебное пособие в 2 т. М.: «БИНОМ. Лаборатория знаний». 2010. Т. 1. С. 567-587.

81. Кулакова А.Н. Природа генетического контроля деградации нафталина и салициловой кислоты у штамма *Pseudomonas putida* BSA202. Дисс. … канд. биол. наук. Пущино, 1988.

82. Кулакова И.И. О возможном механизме синтеза полициклических ароматических углеводородов в процессе эндогенного минералообразования // Докл. АН СССР. 1982. Т. 266. № 4. С. 1001-1003.

83. Курдиш И.К., Антонюк Т.С., Чуйко Н.В. Влияние некоторых факторов внешней среды на хемотаксис *Bradyrhizobium japonicum* // Микробиология. 2001. Т. 70. № 1. С. 106-110.

84. Куюкина и др. Патент 2180276 РФ. Олеофильный биопрепарат, используемый для очистки нефтезагрязненной почвы / Куюкина М.С., Ившина И.Б. Опубл. 10.03.2002. Бюл. №7.

85. Куюкина М.С., Ившина И.Б., Осипенко М.А., Няшин Ю.И., Коростина О.А. Модель нефтеотмывания загрязненного почвогрунта под действием *Rhodococcus*-биосурфактанта // Российский журнал биомеханики. 2006. Т. 10. № 1. С. 59-67.

86. Ланге К.Р. Поверхностно-активные вещества: синтез, свойства, анализ, применение. Пер. с англ. / Под науч. ред. Л.П. Зайченко. СПб: Профессия, 2004. 240 с.

87. Ленгелер Й. Современная микробиология. Прокариоты. В 2-х томах. Т. 1. Пер. с англ./ Под. ред. Й. Ленгелера, Г. Древса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005. 656 с.

88. Логинов О. Н., Силищев Н. Н., Бойко Т. Ф., Галимзянова Н. Ф. Биотехнологические методы очистки окружающей среды от технологических загрязнений / Уфа: Гос. изд. науч.-техн. лит. Реактив. 2000. 100 с.

89. Логинов О.Н., Нуртдинова Л.А., Бойко Т.Ф., Четвериков С.П., Силищев Н.Н. Оценка эффективности нового биопрепарата Ленойл для ремедиации нефтезагрязненных почв // Биотехнология. 2004. № 1. С. 77-82.

90. Малахов А.А., Гирич И.Е., Нечитайло Т.Ю., Карасева Э.В. Роль нефтеокисляющей микрофлоры в биоремедиации почв и почвогрунтов, загрязненных нефтью. Экология 2000: Эстафета поколений. I Международная школа-семинар по экологии. 2000. С. 23–24.

91. Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., «Мир». 1984. 480 с.

92. Маркарова М. Опыт применения биопрепарата «Универсал» для рекультивации нефтезагрязнённых земель // Вестник Института биологии Коми НЦТУрО РАН. 2004. Вып. 84.

93. Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / [отв. Ред. В. В. Игнатов]; Ин-т биохимии и физиологии растений и микроорганизмов. – М.: Наука, 2005. – 262 с.

94. МУК 4.1.1956-05 «Определение концентрации нефти в почве методом инфракрасной спектрофотометрии»

95. Мурзаков Б.Г., Заикина А.И., Рогачева Р.А., Семенова Е.В. Способ микробиологической очистки объектов от нефтяных загрязнений // Патент РФ 2067993, 1993.

96. Мурыгина В.П., Войшвилло Н.Е., Калюжный С.В. Биопрепарат «Родер» для очистки почв, почвогрунтов, пресных и минерализованных вод от нефти и нефтепродуктов // Патент РФ 2174496, 1999.

97. Назаров А.В., Иларионов С.А. Потенциал использования микробно-растительного взаимодействия для биоремедиации // Биотехнология. 2005. № 5. С. 54-62.

98. Нестеров А.И., Кошелев А.В., Гальченко В.Ф., Иванов М.В. Выживаемость облигатных метанотрофных бактерий при лиофилизации и последующем хранении/ // Микробиология. – 1986. – Т. 55. – Вып. 2. – С. 271-277.

99. Новоселова Е.И. Структурно-функциональная трансформация биогеоценоза при нефтяном загрязнении и пути его восстановления: Монография. Уфа: РИО БашГУ. 2004. 126 с.

100. Оборин А.А., Калачникова И.Г., Масливец Т.А., Базенкова Е.И., Плещева О.В., Оглоблина А.И. Восстановление нефтезагрязнённых почвенных экосистем. М.: Наука, 1988. С. 140-159.

101. Патыка В.Ф., Калиниченко А.Ф., Колмаз Ю.Т., Кислухина М.В. Роль азотфиксирующих микроорганизмов в повышении продуктивности сельскохозяйственных растений. // Микробиол. журнал. 1997. Т. 59. № 4. С. 3-14.

102. Перт С. Д. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М. «Мир». 1978. С. 14-33

103. Петров А.А. Углеводороды нефти. М.: Наука, 1984. 264 с.

104. Пиковский Ю.И. Природные и техногенные потоки углеводородов в окружающей среде. М.: Изд-во МГУ, 1993. 182 с.

105. Пиковский Ю.И., Геннадиев А.Н., Чернянский С.С., Сахаров Г.Н. Проблема диагностики и нормирования почв нефтью и нефтепродуктами // Почвоведение. 2003. № 9. С. 1132-1140

106. Плешакова Е.В., Позднякова Н.Н., Турковская О.В. Получение нефтеокисляющего биопрепарата путём стимуляции аборигенной углеводородокисляющей микрофлоры // Прикл. Биохим. Микробиол. 2005. Т. 41. № 6. С. 634-639.

107. ПНД Ф 14.1:2:4.168-2000 количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах питьевых, природных и очищенных сточных вод методом ик-спектрофотометрии с использованием концентратомера КН-2. М., 2000.

108. Поконова Ю.В. Нефть и нефтепродукты. С.-Пб.: «Синтез». 2003. 902 с.

109. Пориц А.Л., Боронин А.М., Скрябин Г.К. Штамм *Pseudomonas aeruginosa*, растущий на углеводородах нефти // Прикл. Биохим. Микробиол. 1983. Т. 19. Вып. 3. Р. 347-352.

110. Понаморева О.Н., Решетилов А.Н., Решетилова Т.А., Шкидченко А.Н., Кошелева И.А., Иванова Е.С., Блохин И.В. Биотехнология защиты окружающей среды. Учебное пособие. Тула: Изд-во ТулГУ, 2006. 114 с.

111. Практикум по микробиологии: Учеб. Пособие для студ. высш. учеб. заведений / Под ред. Нетрусова А.И. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.

112. Прозоров А.А. Горизонтальный перенос у бактерий: лабораторное моделирование, природные популяции, данные геномики. Микробиология, 1999, Т. 68, № 5, с. 635-646.

113. Пунтус И.Ф., Филонов А.Е., Ахметов Л.И., Карпов А.В., Боронин А.М. Деградация фенантрена бактериями родов *Pseudomonas* и *Burkholderia* в модельной почве. Микробиология, 2008, С. 398-405.

114. Пырченкова И.А., Гафаров А.Б., Пунтус И.Ф., Филонов А.Е., Боронин А.М. Выбор и характеристика активных психротрофных микроорганизмов-деструкторов нефти // Прикл. Биохим. Микробиол. 2006. Т. 42. № 3. С. 298-305.

115. Ревелль П., Ревелль Ч. Среда нашего обитания. Загрязнение воды и воздуха. М.: Мир, 1995, с. 296.

116. Рогозина Е. А., Андреева О.А., Жаркова С.И., Мартынова Д.А., Орлова Н.А. Сравнительная характеристика отечественных биопрепаратов, предлагаемых для очистки почв и грунтов от загрязнения нефтью и нефтепродуктами. // Нефтегазовая геология. Теория и практика. 2010. Т. 5. №3. С.1-18.

117. Саксон В.М., Кузнецов С.А., Кретов А.В., Хромых Д.П., Бойкова И.В., Новикова И.И., Конев Ю.Е., Чумакова А.Я. Биопрепарат для очистки объектов окружающей среды от нефти и нефтепродуктов // Патент РФ 2138451, 1997.

118. Сидоров Д.Г.//Современные методы очистки территорий от нефтяных загрязнений (мат. конф.).М.: НТЦ ЛУКойл, 1996. С.50-54.

119. Сидоров Д.Г., Борзенков М.Б., Мелехина Е.И., Беляев С.С., Иванов М.В. Микробиологическая деструкция мазута в почве при использовании биопрепарата «Деворойл» // Прикл. Биохим. Микробиол.1998. Т.34. № 3. С. 281-286.

120. Скрябин Г.К., Кочетков В.В., Еремин А.А., Перебитюк А.Н., Старовойтов И.И., Боронин А.М. pBS4 - новая плазмида биодеградации нафталина // Докл. АН СССР. 1980. Т. 250. № 3. С. 212-215.

121. Скрябин Г.К., Головлева Л.А. Биотехнология очистки окружающей среды от ксенобиотиков. // Изв. АН СССР: Сер. Биологическая. 1986. № 6. С. 805-813.

122. Соколов С.Л., Кошелева И.А., Филонов А.Е., Боронин А.М. Влияние транспозонов на экспрессию генов биодеградации нафталина у штамма *Pseudomonas putida* BS202 (NPL-1) и его производных // Микробиология. 2005. Т. 74. № 1. С.79-86.

123. Сребняк Е.А., Ботвинко И.В., Малахова Д.В., Винокуров В.А. Способ получения биопрепарата для восстановления водоёмов, загрязненных нефтью и нефтепродуктами // Патент РФ 2327649, 2006.

124. Сребняк Е.А., Терехова В.А., Федосеева Е.В., Ботвинко И.В., Винокуров В.А. Биопрепарат «Морской снег» для восстановления акваторий, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, и его экотоксикологическая оценка. Экология и промышленность России. Сентябрь, 2008, с. 42-44.

125. Стабникова Е.В., Селезнева М.В., Рева О.Н., Иванов В.Н. Выбор активного микроорганизма-деструктора углеводородов для очистки нефтезагрязненных почв // Прикл. Биохим. Микробиол. 1995. №5. С. 534-539.

126. Стадницкий Г.В. Экология: Учеб. пособие / Г.В. Стадницкий, А.И. Радионов. М.: Высш. шк., 1988. 272 с.

127. Станкевич Д.С. Использование углеводородокисляющей бактерии *Pseudomonas* для биоремидиации нефтезагрязненных почв. Автореф. … дис. канд. биол. наук. М., 2002.

128. Суржко Л. Ф., Финкельштейн 3. И., Баскунов Б. П., Янкевич М. И., Яковлев В. И., Головлева Л. А. Утилизация нефти в почве и воде микробными клетками // Микробиология. 1995. Т. 64. № 3. С. 393-398.

129. Тихонов А.Н. Молекулярные моторы. Часть 1. Вращающиеся моторы живой клетки // Сорос. Образ. Жур. 1999. No 6. С. 8–16.

130. Толкачев Н.З. Потенциальные возможности симбиотической азотфиксации при выращивании сои на юге Украины. // Микробиол. журнал. 1997. Т. 59. С. 34-41.

131. Филонов А.Е., Боронин А.М. Стабильность плазмид и конкурентоспособность плазмидосодержащих и бесплазмидных штаммов при непрерывном культивировании // Антибиотики и Химиотерапия. 1990. Вып. 35. № 5. С. 46–50.

132. Филонов А.., 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 РФ 2312891, 2006.

133. Хабибуллин Р.А., Коваленко М.В. Состояние исследований по оценке и ликвидации последствий загрязнения почвы нефтью по её фитотоксичности // Рекультивация земель в СССР: Тез. докл. всесоюзн. науч.-техн. конф. М., 1982. Т.2. С. 149-152.

134. Хоменков К.Г., Шевелев Л. В., Жуков В. Г., Курлович А. Е., Загустина Н. А., Попов В. О. Молекулярно-генетическая характеристика метаболических путей утилизации ароматических углеводородов консорциумами микроорганизмов // Прикл. Биохим. Микробиол. 2005. Т. 43. №3. 298-302.

135. Хомякова Д. В., Ботвинко И. В., Нетрусов А. И. Выделение психроактивных углеводородокисляющих бактерий из нефтезагрязненных почв // Прикл. Биохим. Микробиол. 2003. Т. 39. № 6. С. 661-664.

136. Цуцаева А.А. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под ред. А.А. Цуцаевой. Киев: Наукова думка, 1983. 240 с.

137. Черников В.А. Алексахин Р.М., Голубев А.В. и др. Агроэкология. Под ред. В.А. Черникова, А.И. Чекереса. М.: Колос. 2000. 536с.

138. Чугунов В. А., Ермоленко З. М., Жиглецова С. К., Мартовецкая И. И., Миронова Р. И., Жиркова Н. А., Холоденко В. П., Ураков Н. Н. Создание и применение жидкого препарата на основе ассоциации нефтеокисляющих бактерий // Прикл. Биохим. Микробиол. 2000. Т. 36. № 6. С. 666-671.

139. Чуйко Н.В., Антонюк Т.С., Курдши И.К. Хемотаксис Bradyzhizobium japonicum к различным органическим соединениям. // Микробиология. 2002. Т. 71. № 4. С. 460-466.

140. Шапоренко С.И. Проблемы загрязнения морских акваторий нефтепродуктами и поиск путей её решения // Водные ресурсы. 2007. Т.34. №1. С. 116-118.

141. Шестопалов А.М., Забелин В.А., Алексеев А.Ю. Препарат для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов // Патент РФ 2337069, 2007.

142. Шилова И.И. Биологическая рекультивация нефтезагрязненных земель в условиях таежной зоны // Восст. нефтезагр. почв. экос. М.: Наука, 1988. С. 112-122.

143. Шкидченко А.Н., Аринбасаров М.У. Изучение нефтедеструктивной активности микрофлоры прибрежной зоны Каспийского моря // Прикл. биохим. и микробиол. 2001. Т. 38. № 5. С. 509-512.

144. Шкидченко А.Н., Гафаров А.Б., Иванова Е.С., Есикова Т.З. Биодеградация нефтешламов в открытой проточной системе // Биотехнология. 2007. Т.6. С.55-59.

145. Штина Э.А., Некрасова К.А. Водоросли загрязненных нефтью почв: состояние вопроса и задачи исследования // Восст. нефтезагр. почв. экос. М.: Наука, 1988. С. 57-81.

146. Щеблыкин И.Н., Биттеева М.Б., Бирюков В.В. Биовосстановление загрязненной нефтью почвы при ликвидации последствий аварии на магистральном нефтепроводе Лисичанск-Тихорецк // Трубопроводный транспорт нефти. 1995. №3, с. 19-28.

147. Экологические проблемы топливно-энергетического комплекса России // Зеленый мир. 2007. № 1-2. С. 6-8.

148. Ягафарова Г.Г., Хлесткий Р.Н., Ягафаров И.Р. Испытания биопрепарата "Родотрин" для ликвидации нефтяных загрязнений на территории Татарстана // Нефтепереработка и нефтехимия. 1998. №7. С. 45-47.

149. Abadias M., Teixido N., Usall J., Benabarre A., Vinas I. Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida* sake using different protective and rehydration media // J. Food Prot. 2001. V. 64. P. 856-861.

150. Abalos A., Pinazo A., Infante M.R., Casals M., Garcia F., Manresa A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes // Langmuir. 2001. V. 17. P. 1367–1371.

151. Abdel-Mawgoud A.M., Hausmann R., Lepine F., Muller M.M., Deziel E. Rhamnolipids: detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation, and bioengineering of production. In: Biosurfactants / Ed. by G. Soberon-Chavez // Microbiology Monographs. 2011. V. 20 P. 13-57.

152. Abdel-Mawgoud A.M., Lepine F., Deziel E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 86. P. 1323–1336.

153. Abouseoud M., Yataghene A., Amrane A., Maachi R. Biosurfactant production by free and alginate entrapped cells of *Pseudomonas fluorescens* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 35. No 11. P. 1303-1308.

154. Adler J. Method for measuring chemotaxis and use of method to determine optimum condition for chemotaxis by Escherichia coli // J. Gen. Microbiol. 1973. V. 74. N 1. P. 77-91.

155. Aislabie J., Foght J., Saul D. Aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from soil near Scott Base, Antarctica. // Polar. Biol. 2000. V. 23. P. 183-188.

156. Anderson T.A., Coats J.R. An overview of microbial degradation in the rhizosphere and its applications for bioremediation / Skipper H.D., Turco R.F. (Eds). Bioremediation: Science and Application. Madison: Soil Sci. Soc. Am. Spec.Pub. 1995, V. 43, p. 135-143.

157. 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. P. 2417-2423.

158. Aquilar J.M., Ashby A.M., Richards A.J., Loake G.J., Watson M.D., Shaw C.H. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. // J. Gen. Microbiol. 1988. V. 134. P. 2741-2746.

159. Armitage J., Schmitt R. Bacterial chemotaxis: Rhodobacter sphaeroides and Sinorhizobium melilory – variation on a theme? // Microbiology. 1997. V. 143. N 12. P. 3671-3682.

160. Asselineau C., Asselineau J. Trehalose-containing glycolipids // Prog. Chem. Fats other Lipids. 1978. V. 16. P. 59–99.

161. Atlas R.M. Bioremediation of petroleum pollutants // Int. Biodeter. Biodegrad. 1995. P. 317-327.

162. Atlas R.V., Bartha R. Effects of some commercial oil herders, dispersants and bacterial inocula on biodegradation of oil in seawater / In: Ahearn and Meyers (Eds.), The microbial degradation of oil pollutants, Louisiana State University. 1973. P. 283-289.

163. Baird C. Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) / In: Enviromental chemistry. University of Western Ontario. W.N. Freeman and Company. New York. 1995. P. 272-274.

164. Balachandran C, Duraipandiyan V, Balakrishna K, Ignacimuthu S. Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in Streptomyces sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil // Bioresour. Technol. 2012. V. 112. P. 83-90.

165. Balba M.T., Al-Daher R., Al-Awadhi N., Chino T., Tsuji H. Bioremediation of oil-contaminated desert soil: the Kuwaiti experience // Environ. Int. 1998. V. 24. P. 163-173.

166. Balba T. Bioremediation of oil-contaminated sites. Case studies involving light and heavy petroleum hydrocarbons // Ph.D. Thesis – Conestoga-Rovers & Associates (Niagara Falls, NY). – 2003.

167. Banat I.M., Makkar R.S., Cameotra S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2000. V. 53. P. 495-508.

168. Banat I., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M., Fracchia L., Smyth T., Marchant R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 87. P. 427–444.

169. Barbour W., Hattermann D. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 57. P. 2635-2639.

170. Beal R., Betts W.B. Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa* // J. Appl. Microbiol. 2000. V. 89. P. 158-168.

171. Beil S., Timmis K, Pieper D. Genetic and biochemical analysis of the *tec* operon suggests a route for evolution of chlorobenzene degradation genes // J. Bacteriol. 1999. V. 181. P. 341-346.

172. Bergstrom S., Theorell H., Davide H. On a metabolic product of *Pseudomonas pyocyanea*, pyolipic acid, active against *Myobacterium tuberculosis* // Ark. Kem. Mineral. Geol. 1946. No 23A. P. 1-12.

173. Betty J. M., Coote G.G., Scott W. J. Some factors affecting the viability of dried bacteria during storage in vacuo // Appl. Microbiol. 1974. V. 4. P. 648-652

174. Binder R. G., K. Numata, D. A. Lowe, T. Murakami, J. L. Brown. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* strain producing glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. No. 10. P. 3321-3326.

175. Birnboim H.C., Doly J.A. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmids DNA // Nucl. Acid. Res. 1979. V. 7. N 6. P. 1513.

176. Bonch-Osmolovskaya E.A., Miroshnichenko M.L., Lebedinsky A.V., Chernyh N.A., Nazina T.N., Ivoilov V.S., Belyaev S.S., Boulygina E.S., Lysov Yu.P., Perov A.N., Mirzabekov A.D. Hippe H., Stackebrandt E., L'Haridon S., Jeanthon C. Radioisotopic, culture based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir // J. Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. No 10. P. 6143-6151.

177. Boronin A.M. Diversity of *Pseudomonas* plasmids: to what extent? // FEMS Microbiol Lett. 1992. V. 100. No 1-3. P. 461-467.

178. Boronin A. M., Grishchenkov V.G., Karpov A.V., Seleznev S.G., Tokarev V.G., Arinbasarov M.U., Gajazov R.R., Kuzmin N.P. Degradation of mazut by selected microbial strains in model systems // Process Biochem. 1997. V. 32. No 1. P. 13-19.

179. Bouchez-Naitali M., Rakatozafy H., Marchal R., Leveau J.Y.,Vandecasteele J.P. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake // J. Appl. Microbiol. 1999. V. 8. P. 421–428.

180. Bredford M. M. Rapid and sensitive method for the quantitationof microgram quantity of protein utilizing the principle of proteindye binding // Ann. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.

181. Bredenbruch F., Nimtz M., Wray V., Morr M., Muller R., Haussler S. Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines // J. Bacteriol. 2005. V. 187. P. 3630–3635.

182. Britton L.N. Microbial Degradation of Aliphatic Hydrocarbons. In: Microbial degradation of organic compounds / In: Gibson D.T. (Ed.). Marcel Dekker, New York. 1984. P. 89-129.

183. Brokamp A.F., Schmidt R. J. Survival of *Alcaligenes xylosoxidans* degrading 2,2-dichloropropionate and horizontal transfer of its halidohydrolase gene in a soil microcosm // Curr. Microbiol. 1991. V. 22. P. 299-306.

184. Brzostowicz P.C., Walters D.M., Jackson R.E., Halsey K.H., Ni H., Rouvière P.E. Proposed involvement of a soluble methane monooxygenase homologue in the cyclohexane-dependent growth of a new *Brachymonas* species // Environ. Microbiol. 2005. V.7. №2. P. 179-90.

185. Burger M.M., Glaser L., Burton R.M. The enzymatic synthesis of a rhamnose-containing glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa* // J. Biol. Chem. 1963. V. 238. P. 2595–2602.

186. Burton N.F., Day M.J., Bull A.T. Distribution of bacterial plasmids in clean and polluted sites in a South Wales river // Appl. Environ. Microbiol. 1982. V. 44. № 5. P. 1026–1029.

187. Caetano-Anolles G., Crist-Estes D., Bauer W.D. Chemotaxis of *Rhizobium metiloti* to the plant flavone luteolin requires functional modulation genes // J. Bacteriol. 1988. V. 171. P. 3164-3169.

188. Caetano-Anolles G., Wall L.G., Micheli A.T., Macchi E.M., Bauer W.D., Favelukes G. Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti* // Plant Physiology. 2001. V. 86. P. 1228-1235.

189. Calabrese E.J., Blain R.B. Hormesis and plant biology // Environ. Pollut. 2009. V.157. P. 42-48.

190. Cameotra S.S, Singh P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species // Microb. Cell Fact. 2009. V. 11. P. 8-16.

191. Campos-Garcia J. The *Pseudomonas aeruginosa rhlG* gene encodes an NADPH-dependent beta-ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis // J. Bacteriol. 1998. V. 180. P. 4442–4451.

192. Canosa I., J. M. Sanchez-Romero, L. Yuste, and F. Rojo. A positive feedback mechanism controls expression of AlkS, the transcriptional regulator of the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway // Mol. Microbiol. 2000. V. 35. P. 791–799.

193. Carberry J.B., Wik J. Comparison of *ex situ* and *in situ* bioremediation of unsaturated soils contaminated by petroleum // J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng. 2001. V. 36. № 8. P. 1491-503.

194. Castaldi F. Tank-based bioremediation of petroleum waste sludges // Environ. Progress. 2003. V. 22. No 1. P. 25-36.

195. Cerniglia C.E. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons / In: Laskin A (Ed). Adv. Appl. Microbiol. Academic Press. New York. 1984. V. 30. P.31-37.

196. Chaillan F., Chaineau C.H., Point V., Saliot A., Outdot J. Factors inhibiting bioremediation of soil contaminated with weathered oils and drill cuttings // Environ. Pollution. 2006. V. 144. No. 1. P. 255-265.

197. Chakrabarty A.M. Plasmids in *Pseudomonas* // Ann. Rev. Genet. 1976. V.10, P.7-30.

198. Cheng Q., Thomas S.M., Kostichka K., Valentine J.R., Nagarajan V. Genetic analysis of a gene cluster for cyclohexanol oxidation in *Acinetobacter* sp. strain SE19 by *in vitro* transposition // J. Bacteriol. 2000. V. 182. №. 17. P. 4744 - 4751.

199. Chikere C.B., Okpokwasili G.C., Chikere B.O. Bacterial diversity in a tropical crude oil-polluted soil undergoing bioremediation // Afr. J. Biotech. 2009. № 8. P. 2535–2540

200. Christensen B.B., Sternberg C., Andersen J. Bo, Eberl L., Møller S., Givskov M., Molin S. Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. №. 6. P. 2247-2255.

201. Christofi N., Ivshina I.B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation // J. Appl. Microbiol. 2002. V. 93. P. 915–929.

202. Christova N., Tuleva B., Nikolova-Damyanova B. Enhanced hydrocarbon biodegradation by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain // Zeitschrift für Naturforschung. 2003. V. 59c. P. 205-208.

203. Cirigliano M.C,. Carman G.M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica* // Appl. Environ. Microbiol. 1984. V. 48. No 4. P. 747-750.

204. Cirigliano M.C., Carman G.M. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica* // Appl. Environ. Microbiol. 1985. V. 50. No 4. P. 846-50.

205. Connors M.A., Barnsley E.A. Naphthalene plasmid in pseudomonads // J. Bacteriol. 1982. V. 149. No 3. P. 1096-1101.

206. Conrad P.B., Miller D.P., Cielenski P.R., de Pablo J.J. Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices // Cryobiology. 2000. V. 41. P. 17-24.

207. Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surfase-active agents from two *Bacillus species* // Appl. Env. Microbiol. 1987. V. 53. No 2. P. 224-229.

208. Costa E., Usall J., Teixido N., Garcia N., Vinas I. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying // J. Appl. Microbiol. 2000. V. 89. P. 793-800.

209. Crowley D.E., Brennerova M.V., Irwin C., Brenner V., Focht D. D. Rhizosphere effect on biodegradation of 2,5-dichlorobenzoate by a luminescent strain of root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* // FEMS Microb. Ecol. 2006. V. 20. №. 2. P. 79-89.

210. Daane L.L., Molina J.A.E., Berry E.C., Sadowsky M.J. Influence of earthworm activity on gene transfer from *Pseudomonas fluorescens* to indigenous soil bacteria // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 56. № 2. P. 515-521.

211. Daane L.L., Molina J.A.E., Sadowsky M.J. Plasmid transfer between spatially separated donor and recipient bacteria in earthworm-containing soil microcosms // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. № 2. P. 679-686.

212. Dabrock B., Kesseler M., Averhov B., Gottschalk G. Identification and characterization of a transmissible linear plasmid from *Rhodococcus erythropolis* BD2 that encodes isopropylbenzene and trichloroethene catabolism // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. P. 853-860.

213. Dams-Kozlowska H., Mercaldi M.P., Panilaitis B.J., Kaplan D.L. Modifications and applications of the *Acinetobacter venetianus* RAG-1 exopolysaccharide, the emulsan complex and its components // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 81. No. 2. P. 201-210.

214. Davey M.E., Caiazza N.C., O'Toole G.A. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // J. Bacteriol. 2003. V. 185. No 3. P.1027–1036.

215. Davies J.I., Evans W.C. Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads. The ring-fission mechanism // Biochem. J. 1964. P. 251–261.

216. De Lipthay J.R., Barkay T., Sørensen S.J. Enhanced degradation of phenoxyacetic acid in soil by horizontal transfer of the *tfdA* gene encoding a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dioxygenase // FEMS Microbiol. Ecol. 2001 V. 35. P. 75-84.

217. De Rore H., Demolder K., de Wilde K., Top E., Houwen F., Verstraete W. Transfer of the catabolic plasmid RP4::Tn*4377* to indigenous soil bacteria and its effect on respiration and biphenyl breakdown // FEMS Microbiol. Ecol. 1994b. V. 15. P. 71-78.

218. De Rore H., Top E., Houwen F., Mergeay M., Verstraete W. Evolution of heavy metal resistant transconjugants in a soil environment with a concomitant selective pressure // FEMS Microbiol. Ecol. 1994a. 14. P. 263-274.

219. Dean-Ross D., Moody J.D, Freeman J.P., Doerge D.R., Cerniglia C.E. Metabolism of anthracene by a *Rhodococcus* species // FEMS Microbiol. Lett. 2001. V. 204. No l. P. 205-211.

220. Dejonghe W., Goris J., El Fantroussi S., Höfte M., de Vos P., Verstraete W., Top E.M. Effect of dissemination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation plasmids on 2,4-D degradation and on bacterial community structure in two different soil horizons // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 8. P. 3297-3304.

221. Delille D., Delille B., Pelletier E. Effectiveness of bioremediation of crude oil contaminated subantarctic intertidal sediment: the microbial response // Microb. Ecol. 2002. V.44. № 2. P. 118-126.

222. Delille D., Pelletier E., Coulon F. The influence of temperature on bacterial assemblages during bioremediation of a diesel fuel contaminated Subantarctic soil // Cold Regions Sci. Technol. 2007. V. 48. P. 74-83.

223. Delille D., Coulon F., Pelletier E. Biostimulation of narural microbial assemblages in oil-amended vegetated and desert sub-antarctic soils // Microb. Ecol. 2004. V. 47. P. 407-415.

224. Dennis J., Zylstra G. Complete sequence and genetic organization of pDTG1, the 83 kilobase naphthalene degradation plasmid from *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816-4 // J. Mol. Biology. 2004. V. 341. No 3. P. 753-768.

225. De Rore H., Top E., Houwen F., Mergeay M., Verstraete W. Evolution of heavy metal resistant transconjugants in a soil environment with a concomitant selective pressure // FEMS Microbiol. Ecol. 1994a. V. 14. P. 263-274.

226. Desai J.D., Desai A.J. Production of biosurfactants / *In*: N.Kosaric (ed.), Biosurfactants: production, properties, applications. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1993. P.65-97

227. Desai J., Banat I. Microbial production of surfactants and their commercial potential // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997. V. 61. No 1. P. 47–64.

228. Deziel E., Lepine F., Milot S., He J., Mindrinos M.N., Tompkins R.G., Rahme L.G. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 1339–1344.

229. Deziel E., Lepine F., Milot S., Villemur R. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids // Microbiol. 2003. V. 149. P. 2005–2013.

230. Deziel E.F., Lepine F., Dennie D., Boismenu D., Mamer O.A., Villemur R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1440. P. 244-252.

231. Di Gioia D., Peel M., Fava F., Wyndham R.C. Structures of homologous composite transposons carrying *cbaABC* genes from Europe and North America // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. P. 1940-1946.

232. Diaz E., Ferrandez A., Prieto M.A., Garcia J.L. Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2001. V. 65. No. 4. P. 523-569.

233. DiGiovanni G.D., Neilson J.W., Pepper I.L., Sinclair N.A. Gene transfer of *Alcaligenes eutrophus* JMP134 plasmid pJP4 to indigenous soil recipients // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 7. P. 2521-2526.

234. Dombek P.E., Jonson L.K., Zimmrley S.T., Sadowsky M.J. Use of repetitive DNA sequences and the PCR To differentiate Escherichia coli isolates from human and animal sources // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 6. P. 2572–2577.

235. Don R.H., Pemberton J.M. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus* // J. Bacteriol. 1981. V. 145. P. 681-686.

236. Dua R.D., Meera S. Purification and characterisation of naphthalene oxygenase from *Corynebacterium renale* // Eur. J. Biochem. 1981. V. 120. № 3. P. 461-465.

237. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350–356.

238. Dunn N.W., Gunsalus I.C. Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida* // J. Bacteriol. 1973. V. 114. P. 974-979.

239. Dunn N.W., Dunn H.W., Austen R.A. Evidence for the existence of two catabolic plasmids coding for the degradation of naphthalene // J. Gen. Microbiol. 1980. V. 117. P. 529.

240. Dunn N.W., Gunsalus I.C. Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida* // J. Bacteriol. 1973. V.114. P. 974-979.

241. Dutta T. K., Harayama S. Biodegradation of *n*-alkylcycloalkanes and *n*-alkylbenzenes via new pathways in *Alcanivorax* sp. strain MBIC 4326 // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. № 4. P. 1970-1974.

242. Edwards J.R., Hayashi J.A. Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* // Arch. Biochem. Biophys. 1965. V. 111. P. 415-421.

243. Ensly B.D., Gibson D.T. Naphthalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase component // J. Bacteriol. 1983. V. 155. № 2. P. 505-511.

244. Escalante-Espinosa E., Gallegos-Martinez M.E., Favela-Torres E., Gutierrez-Rojas M. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system // Chemosphere. 2005. V. 59. P. 405-413.

245. Espuny M.J., Egido S., Mercade M.E., Manresa A. Characterization of trehalose tetraester produced by a waste lubricant oil degrader *Rhodococcus* sp. // Toxicol. Environ. Chem. 1995. V. 48. P. 83–88.

246. Espuny M.J., Egido S., Rodon I., Manresa A., Mercade M.E. Nutritional requirements of a biosurfactant producing strain *Rhodococcus* sp. 51T7 // Biotechnol. Lett. 1996 V. 18. P. 521–526.

247. Evans C.G.T., Herbert D., Tempest D.B. The continiuous cultivation of microorganisms. 2. Construction of a Chemostat // Methods in Microbiol. 1970. V.2. P. 277-327.

248. Feist C.F., Hegeman G.D. Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida*: regulation of tangential pathways // J. Bacteriol. 1969. V. 100. № 2. P. 869-877.Ornston, 1966.

249. Ferguson S.H., Franzmann P.D., Snape I., Revil A.T., Trefry M.G., Zappia L.R. Effects of tempersture on mineralisation of petroleum in contaminated Antarctic terrestrial sediments. // Chemosphere. 2003. V52. P. 975-987.

250. Ferrari M.D., Neirotti E., Albornoz C. Occurrence of heterotrophic bacteria and fungi in an aviation fuel handling system and its relationship with fuel fouling // Rev. Argent. Microbiol. 1998. V. 30. No 3. P. 105-114.

251. Ferrero M., Llobet-Brossa E., Lalucat J., Garcia-Valdes E., Rossello-Mora R.A., Bosch R. Coexistence of two distinct copes of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas* strains isolated from the western Mediterranean region // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V.68. № 6. P. 957-962.

252. Filonov A.E., Puntus I.F., Karpov A.V., Kosheleva I.A., Kashparov K.I., Slepenkin A.V., Boronin A.M. Efficiency of naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7 in soil // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2004. V. 79. № 6. P. 562-569.

253. 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 // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2006. V. 81. N.2. P. 216-224.

254. 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 / In: Proceedings of the Thirtieth Arctic and Marine Oilspill Program (AMOP) Technical Seminar. June 5 – 7, 2007, Edmonton, Canada, v. 1, p. 319-329.

255. Focht D.D., Searles D.B., Koh S.-Ch. Genetic exchange in soil between introduced chlorobenzoate degraders and indigenous biphenyl degraders // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 10. P. 3910-3913.

256. Foght J.M., McFarlane D.M. Growth of extremophiles on petroleum / In: Seckbach J (ed.). Enigmatic microorganisms and life in extreme environments, 1999. P. 527–538.

257. Forsyth J.V., Tsao Y.M., Blem R.D. Bioremediation: when is augmentation needed? / In: Hinchee R.E. et al. (eds). Bioaugmentation for site remediation, Battelle Press, Columbus, OH. 1995. P. 1-14.

258. Francy D., Thomas J., Raymond R., Ward C. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria // J. Ind. Microbiol. 1991. V. 8. No 3. P. 237-246.

259. Frantz B., Ngai K.L., Chatterjee D.K., Ornston L.N., Chakrabarty A.M. Nucleotide sequence and expression of *clcD*, a plasmid-borne dienelactone hydrolase gene from *Pseudomonas* sp. strain B13 // J. Bacteriol. 1987. V. 169. No 2. P.704-709.

260. Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Smyth T.J.P., Banat I.M. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2010. V. 112. P. 617-627.

261. Fredrickson J.K., Balkwill D.L., Drake G.R., Romine M.F., Ringelberg D.B., White D.C. Aromatic-degrading Sphingomonas isolates from the deep subsurface // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. P. 1917-1922.

262. Fry R.M., Greaves R.I. Long term preservation of fungus culture // Natl. J. Hyg. 1951. V. 49. P. 200.

263. Fu Y., Tang X., Lai Q., Zhang C., Zhong H., Li W., Liu Y., Chen L., Sun F., Shao Z. Flavobacterium beibuense sp. nov., isolated from marine sediment // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2011. V. 61. Pt. 1. P. 205-209.

264. Fuenmayor S.L., Wild M, Boyles A.L., Williams P.A. A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2 // J. Bacteriol. 1998. V. 180. P. 2522-2530.

265. Fuentes S., Méndez V., Aguila P., Seeger M. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications // Appl Microbiol Biotechnol. 2014. V. 98. No 11. P. 4781-4794.

266. Fulthorpe R.R., Wyndham R.C. Transfer and expression of the catabolic plasmid pBRC60 in wild bacterial recipients in a freshwater ecosystems // Appl. Environ. Microbiol. 1991. V. 57. P. 1546-1553.

267. Fulthorpe R.R., Wyndham R.C. Involvement of a chlorobenzoate catabolic transoson, Tn*5721*, in community adaptation to chlorobiphenyl, chloroaniline, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in a freshwater ecosystem // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. No 1. P. 314-325.

268. Gaiek R.L., Lange C.R., Weber A.S. The effects of freeze-drying and storage on a phenol degrading supplement // Water Environ. Res. 1994. V. 66. P. 698-706.

269. Gallego J.L., Loredo J., Llamas J.F., Vazquez F., Sanchez J. Bioremediation of diesel-contaminatcd soils: Evaluation of potential *in situ* techniques by study of bacterial degradation // Biodegradation. 2001. V. 12. No 5. P. 325-335.

270. Garcia-Blanco S., Motelab M., Venosa A.D., Siudan M.T., Lee K., King D.W. Restoration of the oil-contaminated Saint Lawrence River shoreline: bioremediation and phytoremediation / Proceedings of 2001 International oil spill conference. American Petroleum Institute, Washington DC. 2001. P. 303-308.

271. Gautam K.K., Tyagi V.K. Microbial Surfactants: A Review // J. Oleo. Sci. 2006. V. 55. No 4. P. 155-166.

272. Geissdorfer W., Kok R.G., Ratajczak A., Hellingwerf K.J., Hillen W. The genes *rubA* and *rubB* for alkane degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 are in an operon with *estB*, encoding an esterase, and *oxyR* // J. Bacteriol. 1999. V. 181. P. 4292–4298.

273. Gemmell R.T., Knowlas C.J., Utilisation of aliphatic compounds by acidophilic heterotrophic bacteria. The potential for bioremediation of acidic wastewaters contaminated with toxic organic compounds and heavy metals // FEMS Microbiol. Lett. 2000. V. 192. P. 185-190.

274. Gerhardt K.E., Huang X.-D., Glick B.R., Greenberg B.M. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges // Plant Sci. 2009. V.176. P. 20-30.

275. Glaser L., Kornfeld S. The enzymatic synthesis of thymidine-linked sugars. II-Thymidine diphosphate L-rhamnose // J. Biol. Chem. 1961. V. 236. P. 1795–1799.

276. Gobbert U., Lang S., Wagner F. Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola* // Biotechnol. Lett. 1984. V. 6. P. 225–230.

277. Goldstein R.M., Mallory L.M., Alexander M. Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation // Appl. Environ. Microbiol. 1985. V. 50. P. 977-983.

278. Gomes N.C., Kosheleva I.A., Abraham W.R., Smalla K. Effects of the inoculant strain *Pseudomonas putida* KT2442 (pNF142) and of naphthalene contamination on the soil bacterial community // FEMS Microbiol Ecol. 2005. V. 54. No 1. P. 21-33.

279. Gray P. H., Thornton H.G. Soil Bacteria that can decompose certain aromatic compounds // Zentralblatt fur Bakteriologie. 1928. V.73. P.74 -79.

280. Greated A., Lambertsen L., Williams P.A., Thomas C.M., Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* // Environ. Microbiol. 2002. V. 2. P. 856-871.

281. Grimm A.C., Harwood C.S. Chemotaxis of *Pseudomonas* spp. to the polyaromatic hydrocarbon naphthalene. // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. No 10. P. 4111-4115.

282. Grimm A.C., Harwood C.S. NahY- a catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the aromatic hydrocarbon naphthalene. // J. Bacteriology, 1999. V. 181. N 10. 3310-3316.

283. Gunther N.W., Nunez A., Fett W., Solaiman D.K.Y. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 2288–2293.

284. Guo Y.P., Hu Y.Y., Gu R.R., Lin H. Characterization and micellization of rhamnolipidis fractions and crude extracts produced by *Pseudomonas aeruginosa* mutant MIG-N146 // J. Colloid. Interface Sci. 2009. V. 331. P. 356–363.

285. Hada H.S., Sizemore R.K. Incidence of plasmids in marine *Vibrio* spp. isolated from an oil field in the Northwestern Gulf of Mexico // Appl. Environ. Microbiol. 1981 V. 41. № 1. P. 199–202.

286. Hallier-Soulier S., Ducroco V., Truffaut N. Conjugal transfer of a TOL-like plasmid and extension of the catabolic potential of *Pseudomonas putida* F1 // Can. J. Microbiol. 1999. V. 45. No 11. P. 898-904.

287. Hamamura N., Yeager C.M., Arp D.J. Two distinct monooxygenases for alkane oxidation in *Nocardiodes* sp. strain CF8 // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. P. 4992–4998.

288. Hamamura N., Olson S.H., Ward D.M., Inskeep W.P. Microbial population dynamics associated with crude oil biodegradation in diverse soils // Appl. Environ. Microbiol. 2006. № 72. P. 6316–6324.

289. Hamer G., Al-Awadhi N. Biotechnological applications in the oil industry // Acta Biotechnologica. 2000. V. 20. Is. 3-4. P. 335-350

290. Hansen L.D., Nestler C., Ringelberg D., Bajpai R. Extended bioremediation of PAH/PCP contaminated soils from the POPILE wood treatment facility // Chemosphere. 2004. V. 54. No 10. P. 1481-1493.

291. Hanson K.G., Nigam A., Kapadia M., Desai A.J. News & Notes: Bioremediation of crude oil contamination with *Acinetobacter* sp. A3 // Curr. Microbiol. Issue. 1997. V. 35. No 3. P. 191-193.

292. Harayama S., Rekik M. The *meta* cleavage operon of TOL degradative plasmid pWWO comprises 13 genes // Mol.Gen Genet. 1990. V.221. № 1. P. 113-120.

293. Harvey S., Elashvilli I., Valdes J.J., Kamely D., Chakrabarty A.M. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant // Nature Biotech. 1990. V. 8. No. 3. P. 228-230.

294. Harwood C.S., Nichols N.N., Kim M.K., Parales R.E. Identification of the *pcaRK*F gene cluster from *Pseudomonas putida*: involvement in chemotaxis, biodegradation, and transport of 4-hydroxybenzoate. // J. Bacteriol. 1994. V. 176. N 21. P. 6479-6485.

295. Hassanshahian M., Emtiazi G., Cappello S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea // Mar. Pollut. Bull. 2012. 64. No 1. P. 7-12.

296. Hauser G., Karnovsky M.L. Rhamnose and rhamnolipide biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* // J. Biol. Chem. 1957. V. 224. P. 91-105.

297. Hausner M., Wuertz S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 3710-3813.

298. Heath D.J., Lewis C.A., Rowland S.J. // Org. Geochem. 1997. V. 26. N. 11-12. P. 769.

299. Heller G. A quantitative study of environmental factors involved in survival and death of bacteria in the desiccated state // J. Bacteriol. 1941. V. 41. P.109.-126.

300. Herrick J.B., Stuart-Keil K.G., Ghiorse W.C., Madsen E.L. Natural horizontal transfer of a naphthalene dioxygenase gene between bacteria native to a coal tar-cotaminated field site // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. № 6. P. 2330-2337.

301. Hill K.E., Fry J.C., Weightman A.J. Gene transfer in the aquatic environment: persistence and mobilization of the catabolic recombinant plasmid pD10 in the epilithon // Microbiol. 1994. V. 140. P. 1555–1563.

302. Hill K.E., Weightman A.J., Fry J.C. Isolation and screening of plasmids from the epilithon which mobilize recombinant plasmid pD10 // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. № 4. P. 1292-1300.

303. Hill K.E., Top E.M. Gene transfer in soil systems using microcosms // FEMS Microbiol. Ecol. 1998. V. 25. P. 319-329.

304. Hirayama T., Kato I. Novel methyl rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* // FEBS Lett. 1982. V. 139. P. 81-85.

305. Hisatsuka K., Nakahara T., Sano N., Yamada K. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation // Agricul. Biol. Chem. 1971. V. 35. P. 686-692.

306. Hoff R. Bioremediation: an overview of its development and use for oil spill cleanup // Mar. Pollut. Bull. 1993. V. 26. № 9. P. 476-481.

307. Hogan D.A., Buckley D.H., Nakatsu C.H., Schmidt T.M., Hausinger R.P. Distribution of the *tfdA* gene in soil bacteria that do not degrade 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) // Microb. Ecol. 1997. V. 34. No 2. P. 90-96.

308. Hohnstock A.M., Stuart-Keil K.G., Kull E.E., Madsen E.L. Naphthalene and donor cell density influence field conjugation of naphthalene catabolism plasmids // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 7. P. 3088-3092.

309. Hommel R.K., Ratledge C. Biosynthetic mechanisms of low molecular weight surfactants and their precursors molecules / In: Ed. by N. Kosaric. Biosurfactants production, properties, applications, N.Y.: Marcel Dekker, 1993. P. 10-63.

310. Howard D.H. The preservation of bacteria by freezing in glycerol broth // J. Bacteriol. 1956. V. 71. P. 625.

311. http://home.eng.iastate.edu/~tge/ce421-521/brubaker.pdf 27-03-2011 (c.63)

312. http://umbbd.msi.umn.edu

313. http://www.ecoportal.ru/ 27-03-2011

314. http://www.microbiologyprocedure.com/population-interactions/microbial-interactions.html

315. http://www.pollutionissues.com/Na-Ph/Petroleum.html 27-03-2011 (c.62)

316. Huang X.-D., El-Alawi Y., Gurska J., Glick B., Greenberg B. A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils // Microchem. J. 2005. V. 81. P. 139-147.

317. Huesemann M.H., Hausmann T.S., Fortman T.J. Assessment of bioavailability limitations during slurry biodegradation of petroleum hydrocarbons in aged soils // Environ. Toxicol. Chem. 2003. V. 22. No 12. P. 2853-2860.

318. Ionata E., De Blasio P., La Cara F. Microbiological degradation of pentane by immobilized cells of Arthrobacter sp. // Biodegradation. 2005. V. 16. No 1. P. 1-9.

319. Ishige T., Tani A., Sakai Y., Kato N. Long-chain aldehyde dehydrogenase that participates in n-alkane utilization and wax ester synthesis in *Acinetobacter* sp. strain M-1 // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 3481– 3486.

320. Israeli E., Shaffer B.T., Hoyt J.A., Lighthart B., Ganio L.M. Survival differences among freeze-dried genetically engineered and wild-type bacteria // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. P. 594-598.

321. Itoh S., Honda H., Tomita F., Suzuki T. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on *n*-paraffin // J. Antibiotics (Tokyo). 1971. V. 24. P. 855-859.

322. Jarvis F.G., Johnson M.J. A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* // J. Am. Chem. Soc. 1949. V. 71. P. 4124-4126.

323. Jesenska A., Bartos M., Czernekova V., Rychlik I., Pavlik I., Damborsky J. Cloning and expression of the haloalkane dehalogenase gene *dhmA* from *Mycobacterium avium* N85 and preliminary characterization of DhmA // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. No 8. P. 3724-3730.

324. Jirasripongpun K. The characterization of oil-degrading microorganisms from lubricating oil contaminated (scale) soil // Lett. Appl. Microbiol. 2002. V. 35. No 4. P. 296-300.

325. Joslyn M.A. The action of enzymes in dried state and in concentrated solution // J. Science of Food and Agricult. 1951. V. 2. No 7. P. 289–294.

326. Ka J.O., Tieje J.M. Integration and excision of a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid in *Alcaligenes paradoxus* and evidence of its intergeneric transfer // J. Bacteriol. 1994. V. 176. N. 17. P. 5284-5289.

327. Kaczorek E., Urbanowicz M., Olszanowski A. The influence of surfactants on cell surface properties of Aeromonas hydrophila during diesel oil biodegradation // Colloids Surf. B. Biointerfaces. 2010. V. 81. No 1. P. 363-368.

328. Kape R., Parniske M., Werner D. Chemotaxis and nod gene activity of *Bradyrhizobium* in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. // Appl. Environ. Microbiol. 1991. V. 57. N 1. P. 316-319.

329. Kappeli O., Finnerty W.R. Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter* // J. Bacteriol. 1979. V. 40. P. 707–712.

330. Karpati E., Sik T. Host plant specific chemotaxis of *Rhizobia*. // Acta Microbiol. (Hung.). 1992. V. 39. N 3-4. P. 352-353.

331. Kato T., Haruki M., Imanaka T., Morikawa M., Kanaya S. Isolation and characterization of psychrotrophic bacteria from oil-reservoir water and oil sands // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 55. P. 794-800.

332. Kawahara H. The structures and functions of ice crystal-controlling proteins from bacteria // J. Biosci. Bioeng. 2002. V. 94. N. 6. P. 492-496.

333. Kawai Y., Nakagawa Y., Matuyama T., Akagawa T., Itagawa T., Fukase K., Kusumoto S., Nishijima M., Yano I. A typical bacterial ornithine-containing lipid NM-(D)-[3-(hexadecanoyloxy)hexadecanoyl]-ornithine is a strong stimulant for macrophages and a useful adjuvant // FEMS Immun. Med. Microbiol. 1999. V. 23. P. 67-73.

334. Kim B.H., Oh E.T., Ahn Y., Koh S.C. Plant terpene-induced expression of multiple aromatic ring hydroxylation oxygenase genes in *Rhodococcus* sp. strain T104 // J. Microbiol. 2003. V. 41. P. 349-352.

335. Kim D., Kim Y.S., Kim S.K., Kim S.W., Zylstra G.J., Kim Y.M., Kim E. Monocyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17 // Appl Environ Microbiol. 2002. V. 68. No 7. P. 3270-3278.

336. King E., Ward M., Raney D. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin // J. Lab. Clin. Med. 1954. V. 44. № 2. P. 301-307.

337. Kiyohara H., Nagao K. The catabolism of phenanthrene and naphthalene by bacteria // J. Gen. Microbiol. 1978. V.105. P. 69-75.

338. Klekner V., Kosaric N. Biosurfactants for cosmetics / In: Ed. by N. Kosaric. Biosurfactants production, properties, applications, N.Y.: Marcel Dekker, 1993. P. 329-372.

339. Kretschmer A., Bock H., Wagner, F. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes // Appl. Environ. Microbiol. 1982. V. 44. P. 864−870.

340. Krebs H.A., Wiggins D., Stubbs M., Sols A., Bedoya F. Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate // Biochem J. 1983. V. 214. No 3. P. 657–663.

341. Kroer N., Barkay T., Sørensen S., Weber D. Effect of root exudates and bacterial metabolic activity on conjugal gene transfer in the rhizosphere of marsch plants // FEMS Microbiol. Ecol. 1998. V. 25. P. 375-384.

342. Kuiper I. Lagendijk E.L., Pickford R., Derrick J.P., Lamers G.E., Thomas-Oates J.E., Lugtenberg B.J., Bloemberg G.V. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvn I and putisolvun II, which inhibit formaton and break down existing biofilms // Mol. Micr. 2004. V. 51. P. 97-113.

343. Kumar R., Pandey S., Pandey A. Plant roots and carbon sequestration // Curr. Sci. 2006. V.91. P. 885-890.

344. Kurane R., Hatamochi K., Kakuno T., Kiyohara M. Production of a bioflocculant by *Rhodococcus erythropolis* S-1 grown on alcohols // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1994. V. 58. P. 428–429.

345. Kurtzman C.P., Price N.P., Ray K.J., Kuo T.M. Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella* (*Candida*) *bombicola* yeast clade // FEMS Microbiol Lett. 2010. V.311. No. 2. P. 140-146.

346. Kvitko C.H., Rigatto M.H., Moro A.L., Zavascki A.P. Polymyxin B versus other antimicrobials for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia // J. Antimicrob. Chemother. 2011. V. 66. No. 1. P. 175-179.

347. Lang S., Philp J.S. Surface-active lipids in rhodococci // Ant. van Leeuwen. 1998. V. 74. P. 59–70.

348. Lang S., Wullbrandt D. Rhamnose lipids. biosynthesis, microbial production // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 51 No 1. P. 22-32.

349. Lang S.,Wagner F. Structure and properties of biosurfactants / In: Ed. by N. Kosaric, W.L. Cairns, N.C.C. Gray. Biosurfactants and biotechnology, N.Y.: Marcel Dekker, 1987. P. 21-47.

350. Lange C.R., Weber A.S. The loss of plasmid-encoded phenotype in *Alcaligenes eutrophus*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas putida* during freeze-drying and storage // Water Environ. Res. 1995. V. 67. P. 224-229.

351. Latha Kh., Lalithakumari D. Transfer and expression of a hydrocarbon-dergading plasmid pHCL from *Pseudomonas putid*a to marine bacteria // World J. Microbiol. Biotech. 2001. V. 17. P. 523-528.

352. Lazdunski A.M., Ventre I., Sturgis J.N. Regulatory circuits and communication in gramnegative bacteria // Nat. Rev. Microbiol. 2004. V. 2. P. 581–592.

353. Le Floch S., Merlin F.X., Guillerme M., Dalmazzone C., Le Corre P. A field experimentation on bioremediation: Bioren. // Environ. Technol. 1999. V. 20. P. 897-907.

354. Le Floch S., Merlin F.X., Guillerme M., Tozzolino P., Ballerini D., Dalmazzone C., Lundh T. Bioren: recent experiment on oil polluted shoreline in temperate climate. In: *In-situ* and *on-site* bioremediation. 1997. V. 4. P. 411-417.

355. Leahy J.G., Colwell R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment // Microbiol Rev. 1990. 54. No 3. P. 305–315.

356. Lederberg J. Cell genetics and hereditary symbiosis // Physiol. Rev. 1952. V. 32. P. 403-430.

357. Lee J.G., Levy E.M. Enhancement of the natural biodegradation of condensate and crude oil on beaches of Atlantic Canada / In: Proceeding of 1989 oil spill conference. American Petroleum Institute, Washington DC. 1989. P. 479-486.

358. Lee N., Hwang M., Jung G., Kim Y., Min K. Physical structure and expression of alkBA encoding alkane hydroxylase and rubredoxin reductase from *Pseudomonas maltophilia* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. V. 218. P. 17–21.

359. Lee S.C., Kim S.H., Park I.H., Chung S.Y., Choi Y.L. Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from Bacillus amyloliquefaciens LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity // Arch. Microbiol. 2007. V. 188. No 4. P. 307-312.

360. Leslie S.B., Israeli E., Lighthart B., Crow J.H., Crowe L.M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. P. 3592-3597.

361. Li W., Shi J., Wang X., Han Y., Tong W., Ma L., Liu B., Cai B. Complete nucleotide sequence and organization of the naphthalene catabolic plasmid pND6-1 from *Pseudomonas* sp. strain ND6 // Gene. 2004. V. 336. P. 231-240.

362. Lim D.H., Lee J.Y., Lastoskie C.M. Ability of *Beijerinckia indica* to degrade phenanthrene and reduce hydraulic conductivity // Water Sci Technol. 2010. V. 62. No 12. P. 2953-2960.

363. Lima T.M., Procopio L.C., Brandao F.D., Carvalho A.M., Totola M.R., Borges A.C. Biodegradability of bacterial surfactants // Biodegradation. 2011. V. 22.No 3. P. 585-592.

364. Lin Q., Mendelssohn I.A., Henry C.B., Roberts P.O., Walsh M.M., Overton E.B., Portier R.J. Effects of bioremediation on oil degradation in mineral and sandy salt marsh sediments // Environ. Technol. 2005. V. 20. P. 825-837.

365. Liu Q., Dong M., Zhou W., Ayub M., Zhang Y.P., Huang S. Improved oil recovery by adsorption–desorption in chemical flooding // J. Petrol. Sci. Eng. 2004. V. 43. P. 75–86.

366. Liu Y., Zhang J., Zhang Z. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading *Sphingomonas* sp. strain ZL5 // Biodegradation. 2004. V. 15. No 3. P. 205-212.

367. Lopez-de-Victoria G., Lovell C.R. Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. N 9. P. 2951-2955.

368. Luft J.H. Fine structure of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red // Feder. Proc. 1966. V.25. P.1773-1783.

369. Lynch J.M., Whipps J.M. Substrate flow in the rhizosphere // Plant and soil. 1990. V. 129. No 1. P. 1-10.

370. Makkar R.S., Cameotra S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactants production and their new applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002.V. 58. P. 428–434.

371. Malachovsky K. J., Phelps T.J., Teboli A.B., Minnikin D.E. White D.C. Aerobic mineralization of trichloroethylene, vinyl chloride, and aromatic compounds by *Rhodococcus* species // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. P. 542-548.

372. Maneerat S., Songklanakarin J. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources // Sci. Technol. 2005. V. 27. P. 675–683.

373. Marchal R., Penet S., Solano-Screna F., Vandecasteele J.P. Gasoline and diesel oil biodegradation // Oil Gas Sci. Technol. 2003. V. 58. No. 4. P. 441-448.

374. Margesin R., Hammerle M., Tscherko D. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time // Microb. Ecol. 2007. V. 53. P. 259-269.

375. Margesin R., Schinner F. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 67. P. 3127-3133.

376. Margesin R., Schinner F. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an Alpine glacier skiing Area // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. No 7. P. 3127-3133.

377. Margesin R., Shinner F. Biological decontamination of oil spills in cold environments // J. Chem. Technol. Biotechnol. 1999. V. 74. P. 381-389.

378. Matsufuji M., Nakata K., Yoshimoto A. High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol / Biotechnol. Lett. 1997. V. 19. No 12. P. 1213–1215.

379. Medina G., Juarez K., Valderrama B., Soberon-Chavez G. Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the rhlAB promoter // J. Bacteriol. 2003. V. 185. P. 5976–5983.

380. Megharaj M., Ramakrishnan B., Venkateswarlu K., Sethunathan N., Naidu R. Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective // Environ. Internat. 2011. V.37. P. 1362-1375.

381. Mercaldi M.P., Dams-Kozlowska H., Panilaitis B., Joyce A.P., Kaplan D.L. Discovery of the dual polysaccharide composition of emulsan and the isolation of the emulsion stabilizing component // Biomacromolecules. 2008. V. 9.No 7. P. 1988-1996.

382. Miller C.D., Hall K., Liang Y.N., Nieman K., Sorensen D., Issa B., Anderson A.J., Sims R.C Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons degrading *Mycobacterium* isolates from soil // Microb. Ecol. 2004. V. 48. No 2. P. 230 - 238.

383. Mishra S., Jyot J., Kuhad R., Lal B. Evaluation of inoculum addition to stimulate *in situ* bioremediation of oily sludge contaminated soil // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V.67. P.1675-1682.

384. Miyamoto-Shinohara Y., Imaizumi T., Sukenobe J., Murakami Y., Kawamura S., Komatsu Y. Survival of microbes after freeze-drying and long-term storage // Cryobiol. 2000. V. 41. P. 251-255.

385. Miyamoto-Shinohara Y. Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. Survival of freeze-dried bacteria // J. Gen. Appl. Microbiol. 2008. V. 54. P. 9–24.

386. Mogi T., Kita K. Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics // Cell Mol. Life. Sci. 2000. V. 66. No. 23. P. 3821-3826.

387. Mohn W.W., Stewart G.R. Limiting factors for hydrocarbon biodegradation at low temperature in Arctic soils // Soil Biol. Biochem. 2000. V. 32. P. 1161-1172.

388. Mohn W.W., Radziminski C.Z., Fortin M.C., Reimer K.J. On site bioremediation of hydrocarbons-contaminated Arctic tundra soils in inoculated biopiles // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 57. P. 242-247.

389. Monteiro S.A., Sassaki G.L., de Souza L.M., Meira J.A., Araújo J.M., Mitchell D.A., Ramos L.P., Krieger N. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE614 // Chem. Phys. Lipids. 2007. V. 147. P. 1–13.

390. Moriya K., Horikoshi K. Isolation of benzene-tolerant bacterium and its hydrocarbon degradation // J. Ferment. Bioeng. 1993. V. 76. No. 3. P. 168-173.

391. Murygina V., Arinbasarov M., Kalyuzhnyi S. Bioremediation of oil polluted aquatic systems and soils with novel preparation «Rhoder» // Biodegradation. 2000. V. 11. P. 385-389.

392. Murygina V., Markarova M., Kalyuzhnyi S. Application preparation «Rhoder» for remediation of oil polluted polar marshy wetlands in Komi Republic // Environ. Int. 2005. V. 31. P. 163-166.

393. Muthusamy K., Gopalakrishnan S., Thiengungal K.R., Sivachidambaram P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application // Curr. Science. 2008. V. 94. No 6. P. 736-747.

394. Nancharaiah Venkata Y., Wattiau P., Wuertz S., Bathe S., Mohan Venkata S., Wilderer P.A., Hausner M. Dual labeling of *Pseudomonas putida* with fluorescent proteins for *in situ* monitoring of conjugal transfer of the TOL plasmid // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. No 8. P. 4846-4852.

395. Navon-Venezia S., Zosim Z., Gottlieb A., Legmann R., Carmeli S., Ron E.Z., Rosenberg E. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens* // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. No 9. P. 3240-3244.

396. Neilson I.W., Josephson K.L., Pepper I.L., Arnold R.B., Di Giovanni G.D., Sinclair N.A. Frequency of horizontal gene transfer of a large catabolic plasmid (pJP4) in soil // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. № 11. P. 4053-4058.

397. Newby D.T., Gentry T.J., Pepper I.L. Comparison of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation and plasmid transfer in soil resulting from bioaugmentation with two different pJP4 donors // Appl. Environ. Microbiol. 2000b. V. 66. № 8. P. 3399–3407.

398. Newby D.T., Josephson K.L., Pepper I.L. Detection and characterization of plasmid pJP4 transfer to indigenous soil bacteria // Appl. Environ. Microbiol. 2000a. V. 66. № 1. P. 290-296.

399. Newby D.T., Pepper I.L. Dispersal of plasmid pJP4 in unsaturated and saturated 2,4-dochlorophenoxyacetic acid contaminated soil samples // FEMS Microbiol. Ecol. 2002. 39. P. 157-164.

400. Nichols W.J. The U.S. Environmental Protect Agency: national oil and hazardous substances pollution contingency plan / In: Proceedings of 2001 oil spill conference. American Petroleum Institute, Washington DC. 2001. P. 1479-1483.

401. Nierman W.C., Feldblyum T. Cryopreservation of cultures that contain plasmids // Dev. Ind. Microbiol. 1984. V. 26. P. 423-433.

402. Norman A., Hansen L.H., Sorensen S.J. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool // Phil. Trans. R. Soc. B. 2009. V. 364. P. 2275–2289.

403. Normander B., Christensen B.B., Molin S., Kroer N. Effect of bacterial distribution and activity of conjugal gene transfer on the phylloplane of the bush bean (*Phaseolus vulgaris*) // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 5. P. 1902-1909.

404. Nunez A., Ashby R., Foglia T.A., Solaiman D.K. LC/MS analysis and lipase modification of the sophorolipids produced by *Rhodotorula bogoriensis* // Biotechnol. Lett. 2004. V. 26. P. 1087-1093.

405. Nüβlein K., Maus D., Timmis K., Dwyer D.F. Expression and transfer of engineered catabolic pathways harbored by *Pseudomonas* spp. introduced into activated sludge microcosms // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. № 10. P. 3380-3386.

406. Obayori S.O., Salam L.B. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: role of plasmids // Sci Res Ess. 2010. № 5. P. 4093–4106.

407. Ochsner U.A., Fiechter A., Reiser J. Isolation, characterization, and expressionin Escherichia coli of the *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* genes encoding a rhamnosyl transferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 19787–19795.

408. Ochsner U.A., Reiser J., Fiechter A., Witholt B. Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipd biosurfactants in heterologous hosts // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. P. 3503-3506.

409. Ogawa N., Miyashita K. The chlorocatechol-catabolic transposon Tn*5707* of *Alcaligenes eutrophus* NH9, carrying a gene cluster highly homologous to that in the 1,2,4-trichlorobenzene-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. strain P51, confers the ability to grow on 3-chlorobenzoate // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 2. P. 724-731.

410. Olsen J. *Pseudomonas* degradation of hydrocarbons. United States Patent # 4508824, United States Patent Office, 1985.

411. Olsen R. H., Kukor J.J., Kaphammer B. A novel toluene-3-monooxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO1 // J. Bacteriol. 1994. V. 176. P.3749-3756.

412. Ortiz A., Teruel J.A., Espuny M.J, Marques A., Manresa A., Aranda F.J. Interactions of a bacterial biosurfactant trehalose lipid with phosphatidylserine membranes // Chem. Phys. Lipids. 2009. V.158. P. 46-53.

413. Osborn A.M., Böltner D. When phage, plasmids, and transposons collide: genomic islands, and conjugative- and mobilizable-transposons as a mosaic continuum // Plasmid. 2002. V. 48. P. 202-212.

414. Pandey G., Jain R.K. Bacterial chemotaxis toward environmental pollution role in bioremediation. // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. No 12. P. 5789-5795.

415. Panke S., Meyer A., Huber C.M., Witholt B., Wubbolts M.G. An alkane-responsive expression system for the production of fine chemicals // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V.65. P. 2324–2332.

416. Panyi T., Zolotarjav I., Karpati E., Sik T. Chemical composition of attractants from leguminous plant root exudates. // Acta Microbiol. (Hung.). 1992. V. 39. No 3-4. P. 356-364.

417. Parales R.E., Ditty J.L., Harwood C.S. Toluene-degrading bacteria are chemotaxis toward the environmental pollutants benzene, toluene, and trichloroethylene. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. No 9. P. 4098-4104.

418. Parales R.E., Harwood C.S. Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. // Current Opinion in Microbiology. 2002. V. 5. P. 266-273.

419. Parke D., Rivelli M., Ornston L. Chemotaxis to aromatic and hydroaromatic acids: comparison of *Bradorhyzobium japonicum* and *Rhizobium trifolii*. // J. Bacteriol. 1985. V. 163. No 2. P. 417-422.

420. Pearson J.P., Pesci E.C., Iglewski B.H. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes // J. Bacteriol. 1997. V. 179. P. 5756–5767.

421. Peng F. Wang Y., Sun F., Liu Z., Lai Q., Shao Z. A novel lipopeptide produced by a Pacific Ocean deep-sea bacterium, *Rhodococcus* sp. TW53 // Appl. Microbiol. 2008. V. 105. P. 698-705.

422. Peters M., Heinaru E., Talpsep E., Wand H., Stottmeister U., Heinaru A., Nurk A. Acquisition of a deliberately introduced phenol degradation operon, *pheBA*, by different indigenous *Pseudomonas* species // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63 P. 4899-4906.

423. Pham T.H., Webb J.S., Rehm B.H.A. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stres stolerance and biofilm formation // Microbiol. 2004. V. 150. P. 3405–3413.

424. Pilon-Smits E. Phytoremediation // Annu. Rev. Plant Biol. 2005. V. 56. P. 15-39.

425. Pineda-Flores G., Boll-Arguello G., Lira-Galeana C, Mesta-Howard A.M. A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source // Biodegradation. 2004. V. 15. No 3. P. 145-151.

426. Pineda-Fores G., Mesta-Howard A.M. Petroleum asphaltenes: generated problematic and possible biodegradation mechanisms // Rev. Latinoam. Microbiol. 2001. V.43. No 3. P. 143-150.

427. Piper D.H., Reineke W. Engineering bacteria for bioremediation // Curr. Opin. Biotechnol. 2000. V.11.P.262-270.

428. Piskonen R., Itavaara M. Evaluation of chemical pretreatment of contaminated soil for improved PAH bioremediation // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. V. 65(5). P. 627-634.

429. Piskonen R., Nyyssonen M., Rajamaki T., Itavaara M. Monitoring of accelerated naphthalene-biodegradation in a bioaugmented soil slurry // Biodegradation. 2005. V. 16. No. 2. P. 127-134.

430. Poelarends G., Kulakov L., Larkin M., van Hylckama Vlieg J., Janssen D. Roles of horizontal gene transfer and gene integration in evolution of 1,3-dichloropropene and 1,3-dibromoethane-degradative pathways // J. Bacteriol. 2000. V. 182. P. 2191-2199.

431. Pueppke S., Bolarious-Vasquez M., Werner D. Release of flavonoids by the soybean cultivars McCall and Peking and their perception as a signals by the nitrogen-fixing symbiosis Sinorhizobium fredii. // Plant Physiol. 1998. V. 117. N 2. P. 599-608.

432. Rahim R., Ochsner U.A., Olvera C. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnosyl transferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis // Mol. Microbiol. 2003. V.40. P. 708–718.

433. Rahman K.S, Thahira-Rahman J., Lakshmanaperumalsamy P., Banat I.M. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. // Bioresour. Technol. 2002a. V. 85. No 3. P. 257-261.

434. Rahman K.S., Rahman T., Lakshmanaperumalsamy P., Banat I.M. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils // J. Basic Microbiol. 2002b. V. 42. No 4. P. 284-291.

435. Ramos J.L., Gallegos M.T., Marqués S., Ramos-González M.I., Espinosa-Urgel M., Segura A. Responses of gram-negative bacteria to certain environmental stressors // Curr. Opin. Microbiol. 2001. V. 4. P. 166-171.

436. Ramos-Gonzalez M-I., Duque E., Ramos J.L. Conjugational transfer of recombinant DNA in cultures and in soils: host range of *Pseudomonas putida* TOL plasmids // Appl. Environ. Microbiol. 1991. V. 57. №. 10. P. 3020–3027.

437. Rapp P., Bock H., Wray V., Wagner F. Formation, isolation and characterisation of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes // J. Gen. Microbiol. 1979. V. 115. P. 491–503.

438. Rapp P., Gabriel-Jurgens L.H.E. Degradation of alkanes and highly chlorinated benzenes, and production of biosurfactants, by a psychrophilic *Rhodococcus* sp. and genetic characterization of its chlorobenzene dioxygenase // Microbiol. 2003. V. 149. P. 2879–2890.

439. Raskin I.P., Nanda Kumar B.A., Dushenkov S., Blaylock M.J., Salt D. Emerging technologies in hazardous waste management / In: Proceedings of the VI ACS Industrial & Engineering. Chemistry Division Special Symposium, Atlanta, 1994. P. 345-354.

440. Ravatn R., Zehnder A.J.B., van der Meer J.R. Low-frequency horizontal transfer of an element containing the chlorocatechol degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain B13 to *Pseudomonas putida* F1 and to indigenous bacteria in laboratory-scale activated-sludge microcosms // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. №. 6. P. 2126-2132.

441. Recent research in freezing and drying / In: Ed. by A.S. Parkes, A.U. Smith. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1960. 320 p.

442. Reineke W., Knackmuss H.J. Hybrid pathway for chlorobenzoate metabolism in *Pseudomonas* sp. B13 derivatives // J. Bacteriol. 1980. V. 142. No 2. P. 467-73.

443. Rendell N.B., Taylor G.W., Somerville M., Todd H., Wilson R., Cole J. Characterization of *Pseudomonas* rhamnolipids // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1045. P. 189-193.

444. Reynolds M.D., Friedell G.H. Further observations on tumor extracts causing hemolysis in vitro // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1963. V.114. P.798-801.

445. Richmond S.A., Lindstrom J.E., Braddock J.F. Effects of chitin on microbial emulsification, mineralization potential, and toxicity of Bunker C oil // Mar. Pollut. Bull. 2001. V. 42. P. 773-779.

446. Ristau E., Wagner F. Formation of novel anionic trehalose tetraesters from *Rhodococcus erythropolis* under growth-limiting conditions // Biotechnol. Lett. 1983. V. 5. P. 95–100.

447. Robert M., Mercade M.E., Bosch M.P., Parra J.L., Espuny M.J., Manresa M.A., Guinea J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T // Biotechnol. Lett. 1989. V. 11. P. 871–874.

448. Roling W.F.M., Milner M.G., Jones D.M., Fratepietro F., Swannell R.P.J., Daniel F., Head I.M. Bacterial community dynamics and hydrocarbon degradation during a field-scale evaluation of bioremediation on a Mudflat Beach contaminated with buried oil // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. P. 2603-2613.

449. Ron E.Z. Rosenberg E. Natural roles of biosurfactants // Environ. Microbiol. 2001. V.3. No. 4. P. 229-236.

450. Ron E.Z., Rosenberg E. High- and low-molecular-mass microbial surfactants // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 52. P. 154-162.

451. Rossello-Mora R.A., Laluoat J., Garoia-Valdes E. Comparative biochemical and genetic analysis of naphthalene degradation among *Pseudomonas stutzeri* strains // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. P. 212-219.

452. Rousseaux S., Soulas G., Hartmann A. Plasmid localization of atrazine-degrading genes in newly described *Chelatobacter* and *Arthrobacter* strains // FEMS Microbiol. Ecol. 2002. V41. № 1. P 69-75.

453. Rouviere P.E., Chen M.W. Isolation of *Brachymonas petroleovorans* CHX, a novel cyclohexane-degrading *beta*-proteobacterium // FEMS Microbiol Lett. 2003. V.227. №1. P.101-106.

454. Saboo V.M., Gealt M.A. Gene sequences of the *pcpB* gene of pentachlorophenol-degrading *Sphingomonas chlorophenolica* found in nondegrading bacteria // Can. J. Microbiol. 1998. V. 44. No 7. P. 667-675.

455. Sakaguchi I., Ikeda N., Nakayama M., Kato Y., Yano I., Kaneda K. Trehalose 6,6′-dimycolate (cord factor) enhances neovascularization through vascular endothelial growth factor production by neutrophils and macrophages // Infect. Immunity. 2000. V. 68. No 4. P. 2043–2052.

456. Salihu A., Abdulkadir I., Almustapha M.N. An investigation for potential development on biosurfactants // Biotechnol. Mol. Biol. Rev. 2009. V. 3. No 5. P. 111-117.

457. Salt D.E., Balylock M., Kumar N.P., Dushenkov V.P., Ensley B.D., Chet I., Raskin I. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants // Biotechnology. 1995. V. 13. P. 468-474.

458. Salt D.E., Smith R.D., Raskin I. Phytoremediation // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1998. V. 49. P. 643-668.

459. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. 1989. 480 p.

460. Sanseverino J., Applegate B.M., King J.M.H., Sayler G.S. Plasmid-mediated mineralisation of naphthalene, phenanthrene and anthracene // Appl. Environ. Microbiol.1993. V. 59. P. 1931-1937.

461. Santivarangkna C., Kulozik U., Foerst P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes // J. Appl. Microbiol. 2008. V.105. P.1-13.

462. Sarand I., Haario H., Jørgensen K.S., Romantschuk M. Effect of inoculation of a TOL plasmid containing mycorrhizosphere bacterium on development of Scots pine seedling, their mycorrhizosphere and the microbial flora in *m*-toluate-amended soil // FEMS Microbiol. Ecol. 2000. V. 31. P. 127-141.

463. Sathishkumar M., Binupriya A.R., Baik S.H., Yun S.E. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas // CLEAN – Soil, Air, Water. 2008. V. 36. No. 1. P. 92-96.

464. Satpute S.K., Banpurkar A.G., Dhakephalkar P.K., Banat I.M., Chopade B.A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifers: a review // Crit. Rev. Biotechnol. 2010. V. 30. No 1. P. 127–144.

465. Sayler G.S. The use of DNA: DNA colony hybridization in the rapid isolation of 4-chlorobiphenyl degradative bacterial phenotypes // Microb. Ecol. 1990. V. 19. № 1. P. 1. 20.

466. Schippers A., Bosecker K., Spröer C., Schumann P. *Microbacterium oleivorans* sp. nov. and *Microbacterium hydrocarbonoxydans* sp. nov., novel crude-oil-degrading Gram-positive bacteria // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005. V. 55. Pt. 2. P. 655-660.

467. Schmid-Appert M., Zoller K., Traber H., Vuilleumier S., Leisinger T. Association of newly discovered IS elements with dichloromethane utilization genes of methylotrophic bacteria // Microbiol. 1997. V. 143. P. 2557-2567.

468. Schwartz E., Scow K.M. Repeated inoculation as a strategy for the remediation of low concentrations of phenanthrene in soil // Biodegradation. 2001. V. 12. No 3. P. 201-207.

469. Sen R. Surfactin: biosynthesis, genetics and potential applications // Adv. Exp. Med. Biol. 2010. V. 672. P. 316-323.

470. Sendstad E. Accelerated biodegradation of crude oil on Antarctic shorelines / In: Proceedings of the third arctic and marine oil spill program technical seminar, Ottawa, Canada. 1980. P. 1-8.

471. Sentchilo V.S., Perebituk A.N., Zehnder A.J.B., van der Meer J.R. Molecular diversity of plasmids bearing genes that encode toluene and xylene metabolism in *Pseudomonas* strains isolated from different contaminated sites in Belarus // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 2842-2852.

472. Sharma S.L., Pant A. Biodegradation and conversion of alkanes and crude oil by a marine *Rhodococcus* // Biodegradation Issue. 2000. V. 11. No. 5. P. 289 -294.

473. Shimakata T., Minatogawa Y. Essential role of trehalose in the synthesis and subsequent metabolism of corynomycolic acid in *Corynebacterium matruchotii* // Arch. Biochem. Biophys. 2000. V. 380. P. 331–338.

474. Shonard D.R., Taylor R.T., Tompson A., Knapp R.B. Hydrodynamic effects on microcapillary motility and chemotaxis assays of *Methylosinus trichosporium* // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. No 9. P. 2737-2747.

475. Shukla O.P. Biodegradation for environmental management // Everyman's Sci. 1990. V. 25. №2. P. 46-50.

476. Shuttleworth K.L., Cerniglia C.E. Bacterial degradation of low concentration of phenanthtrene and inhibition by naphthalene // Microb. Ecol. 1996. V. 31. P. 305-317.

477. Sikkema J., de Bont J.A., Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons // Microbiol. Rev. 1995. V. 59. P. 201-222.

478. Simon M., Autenrieth R.L., McDonald T.J., Bonner J.S. Evalution of bioaugmentation for remediation of petroleum in a wetland / In: Proceedings of 1999 International oil spill conference. American Petroleum Institute, Washington DC. 1999. P. 1279-1293.

479. Simons M., Van der Bij A.J., Brand J., de Weger L.A., Wijffelman C.A., Lugtenberg B.J. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomona*s bacteria // Mol. Plant-Microbe Interact. 1996. Vol. 9. № 7. P. 600-607

480. Sims J.I., Sims R.N., Matthews J.E. Approach to bioremediation of contaminated soil // Haz. Waste Haz. Matter. 1990. V. 7. P. 117-149.

481. Singer A.C., Thompson I.P., Bailey M.J. The tritrophic trinity: a source of pollutant-degrading enzymes and its implication for phytoremediation // Curr. Opin.Microbiol. 2004. V. 7. P. 239-244.

482. Singer M.E.V., Finnerty W.R. Physiology of biosurfactant synthesis by *Rhodococcus* species H13-A // Can. J.Microbiol. 1990. V. 36. P. 741-745.

483. Singh A., Van Hamme J.D., Ward O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology. Part 2: application aspects // Biotech. Adv. 2007. V. 250. No. 1. P. 99-121.

484. Siunova T.V., Anokhina T.O., Sizova O.I., Kochetkov V.V., Boronin A.M. Impact of Plant Growth Promoting Rhizobacteria *Pseudomonas* in Phytoremediation Process / In: Ed. by I.A. Golubev. Handbook of Phytoremediation. 2011. Ch. 17. P. 551−572.

485. Smalla K., Heuer H., Gotz A., Niemeyer D., Krogerrecklenfort E., Tietze E. Exogenous isolation of antibiotic resistance plasmids from piggery manure slurries reveals a high prevalence and diversity of IncQ-like plasmids // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 11. P. 4854-4862.

486. Smith R.M. The physiology of aromatic hydrocarbon degrading bacteria / In: C. Ratledge (eds). Biochemistry of microbial degradation, Kluwer Academic Publisher, The Netherlands. 1994. P. 365-367.

487. Smits T.H.M., Balada S.B., Witholt B., van Beilen J.B. Functional analysis of alkane hydroxylases from gram-negative and gram-positive bacteria // J. Bacteriol. 2002. V. 184. No. 6. P. 1733-1742.

488. Soloway D.A., Nahir M., Billowits M.E., Whyte L.G. *In situ* bioremediation of diesel-contaminated soil in Canada Arctic territory // Polar Res. 2001. V. 37. P. 267-272.

489. Southard W.H., Hayashi J.A., Barkulis S.S. Studies of streptococcal cell walls. IV. The conversion of D-glucose to cell wall L-rhamnose // J. Bacteriol. 1959. V.78. P. 79–81.

490. Springael D., Ryngaert A., Merlin C., Toussaint A., Mergeay M. Occurrence of Tn*4371*-related sequences in (chloro-)biphenyl degrading bacteria // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. P.42-50.

491. Springael D., Top E.M. Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies // Trends Microbiol. 2004. V. 12. No 2. P. 53-58.

492. Springael D., van Thor J., Goorissen H., Ryngaert A., De Baere R., Van Hauwe P., Commandeur L.C.M., Parsons J.R., De Wachter R., Mergeay M. RP4::Mu3A mediated in vivo cloning and transfer of a chlorobiphenyl catabolic pathway // Microbiol. 1996. V. 142. P. 3283-3293.

493. Stallwood B., Shears J., Williams P.A., Hugues K.A. Low temperature bioremediation of oil-contaminated soil using biostimulation and bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. from maritime Antarctica // J. Appl. Microbiol. 2005. V. 99. P. 794-802.

494. Strieker M., Marahiel M.A.The structural diversity of acidic lipopeptide antibiotics // Chem. Biochem. 2009. V. 10. No. 4. P. 607-616.

495. Stuart-Keil K.G., Hohnstock A.M., Drees K.P., Herrick J.B., Madsen E.L., Plasmids responsible for horizontal transfer of a naphtalene catabolism genes between bacteria at a coal tar-cotaminated site are homologous to pDTG1 from *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 10. P. 3633-3640.

496. Suni S., Kosunen A.-L., Hautala M., Pasila A., Romantschuk M. Use of a by-product of peat excavation, cotton grass fibre, as a sorbent for oil-spills // Mar. Pol. Bulletin. 2004. V. 49. P. 916-921.

497. Sutherland J.B., Rafil F., Khan A.A., Cerniglia C.E. Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation / In: Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. Willey-Liss, Inc. 1995. P. 269-306.

498. Swannell R.P.J., Lee K., McDonagh M. Field evaluations of marine oil spill bioremediation // Microbiol. Rev. 1996. V.60. №2. P. 342-365.

499. Syldatk C., Lang S., Matulovic U., Wagner F. Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874 // Z. Naturforsch. 1985. V. 40. P. 61-67.

500. Syldatk C., Lang S., Wagner F., Wray V., Witte L. Chemical and physical characterization of four interfacial active rhamnolipids from *Pseudomonas* sp. DSM 2874 grownon n-alkanes // Z. Naturforsch. 1985. V. 40. P. 51–60.

501. Tadashi F., Tatsuya N., Koji T., Junichi K. Biotransformation of various alkanes using the Escherichia coli expressing an alkane hydroxylase system from *Gordonia* sp. TF6 // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2004. V. 68. №. 10. P. 2171-2177.

502. Tagger S., Truffaut N., Le Petit J. Physiological and genetic features of naphthalene metabolism by two bacteria isolated from a matine sediment // J. Bacteriol. Marine. 1984. V. 331. P. 191.

503. Tan H.M. Bacterial catabolic transposons // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 51. P. 1-12.

504. Tan H.M., Joannou C.L., Cooper C.E., Butler C.S., Cammack R., Mason J.R. The effect of ferredoxin(BED) overexpression on benzene dioxygenase activity in *Pseudomonas putida* ML2 // J Bacteriol. 1994. V. 176. No 9. P. 2507-2512.

505. Taylor L.T., Jones D.M. Bioremediation of coal tar PAH in soils using biodiesel // Chemosphere. 2001. V. 44. No 5. P. 1131-1136.

506. Teas Ch., Kalligeros S., Zanikos F., Stournas S., Lois E., Anastopoulos G. Investigation of the effectiveness of absorbent materials in oil spill clean up // Desalination. 2001. V. 140. P. 259-264.

507. Thapa B., Kumar A., Ghimire A. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil // Kathmandu Univ. J. Sci. Engin. Technol. 2012. V. 8. No. 1. P.164-170.

508. Thomas C.M., Nielsen K.M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria // Microbiology. 2005. V.3. P. 711-721.

509. Thomassin-Lacroix E.J.M., Eriksson M., Reimer K.J., Mohn W.W. Biostimulation and bioaugmentation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 59. P. 551-556.

510. Thouand G., Bauda P., Oudot J., Kirsch G., Sutton C., Vidalie S. Laboratory evaluation of crude oil biodegradation with commercial or natural microbial inocula // Can. J. Microbiol. 1999. V.45. P.106-115.

511. Tiago I., Paula Chung A., Veryssimo An. Bacterial diversity in a nonsaline alkaline environment: heterotrophic aerobic populations // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 12. P. 7378–7387.

512. Tiirola M.A., Wang H., Paulin L., Kulomaa S.M. Evidence for natural horizontal transfer of the *pcpB* gene in the evolution of polychlorophenol-degrading Sphingomonads // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. P. 4495-4501.

513. Tokumoto Y., Nomura N., Uchiyama H., Imura T., Morita T., Fukuoka T., Kitamoto D. Structural characterization and surface-active properties of a succinoyl trehalose lipid produced by *Rhodococcus* sp. SD-74 // J. Oleo Sci. 2009. V. 58. P. 97–102.

514. Toledo F.L., Calvo C, Rodelas B., Gonzalez-Lopez J. Selection and identication of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities // Syst. Appl. Microbiol. 2006. V. 29. No 3. P. 244-252.

515. Top E.M., Van Daele P., De Saeyer N., Forney L.J. Enhancement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation in soil by dissemination of catabolic plasmids // Ant. Van Leeuwen. 1998. V. 73. P. 87-94.

516. Top E.M., Van Daele P., De Sayer N., Forney L.J. Enhancement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation in soil by dissemination of catabolic plasmids // Ant. Van Leeuwen. 1998. V. 73. P. 87-94.

517. Top E.M., Maila M., Clerinx M., Goris J., De Vos P., Verstraete W. Methane oxidation as a method to evaluate the removal of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid from

soil by plasmid-mediated bioaugmentation // FEMS Microb. Ecol. 1999. V. 28. №. 3. P. 203-213.

518. Top E.M., Moenne-Loccoz Y., Pembroke T., Thomas C.M. Phenotypic traits conferred by plasmids // The horizontal gene pool. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 2000. P. 249-285.

519. Top E., Springael D., Boon N. Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters // FEMS Microbiol. Ecol. 2002. V. 42. P. 199–208.

520. Top E.M., Springael D. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds // Curr. Opin. Biotechnol. 2003. V. 14. No 3. P. 262-269.

521. Toren A., Navon-Venezia S., Ron E.Z., Rosenberg E. Emulsifying activities of purified Alasan proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53 // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. No 3. P. 1102-1106.

522. Toren A., Orr E., Paitan Y., Ron E.Z., Rosenberg E. The active component of the bioemulsifier alasan from *Acinetobacter radioresistens* KA53 is an OmpA-like protein // J. Bacteriol. 2002. V. 184. P. 165–170.

523. Toren A., Ron E.Z., Bekerman R., Rosenberg E. Solubilization of polyaromatic hydrocarbons by recombinant bioemulsifier AlnA // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 59. No 4-5. P.580-584

524. Toussaint A., Merlin C. Mobile elements as a combination of functional modules // Plasmid. 2002. V. 47. P. 26-35.

525. Toussaint A., Merlin C., Monchy S., Abderrafi Benotmane M., Leplae R., Mergeay M., Springael D. The biphenyl- and 4-chlorobiphenyl-catabolic transposon Tn*4371*, a member of a new family of genomic islands related to IncP and Ti plasmids // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 4837-4845.

526. Tralau T., Cook AM., Ruff J. Map of the IncP*β* plasmid pTSA encoding widespread genes (*tsa*) for *p*-toluenesulfonate degradation in *Comamonas testosteroni* T-2 // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. P. 1508-1516.

527. Trevors, J. T., G. Berg. Conjugal RP4 transfer between pseudomonads in soil and recovery of RP4 plasmid DNA from soil // Syst. Appl. Microbiol. 1989. V. 11. P. 223-227.

528. Tsuda M., Iino T. Naphthalene degrading genes on plasmid NAH7 are on a defective transposon // Mol. Gen. Genet. 1990. Vol. 223. P.33-39.

529. Tsuda M., Tan H.M., Nishi A., Furukawa K. Mobile catabolic genes in bacteria // J. Biosci. Bioeng. 1999. V. 87. P. 401-410.

530. Tsutsumi H., Kono M., Takai K., Manabe T. Bioremediation on the shore after an oil spill from Nakhodka in the Sea of Japan. III. Field test of a bioremediation agent with microbiological cultures for the treatment of an oil spill // Mar. Pollut. Bul. 2000. V. 40. P. 320-324.

531. Tuleva B., Christova N., Cohen R., Stoev G., Stoineva I. Production and structural elucidation of trehalose tetraesters (biosurfactants) from a novel alkanothrophic *Rhodococcus wratislaviensis* strain // J. App. Microbiol. 2008. V. 104. P. 1703–1710.

532. Uchida Y., Tsuchiya R., Chino M., Hirano J., Tabuchi T. Extracellular accumulation of mono- and di-succinoyl trehalose lipids by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes // Agricul. Biol. Chem. 1989. V. 53. P. 757–763.

533. Van Beilen J. B., Wubbolts M. G. and B. Witholt. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans* // Biodegradation 1994. V.5. P.161–174.

534. Van Beilen J.B., Li Z., Ductz W.A., Smits T.H.M., Witholt B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment // Oil & Gas Science and Technology Rev. IFP. 2003. V. 58. No. 4. P. 427-440.

535. Van der Meer J.R., Werlen C., Nishino S.F., Spain J.C. Evolution of a pathway for chlorobenzene metabolism leads to natural attenuation in contaminated groundwater // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. P. 4185-4193.

536. Van der Meer J.R., Ravatn R., Sentchilo V. The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13 and other mobile degradative elements employing phage-like integrases // Arch. Microbiol. 2001. V. 175. P. 79-85.

537. Van der Meer J.R., Sentchilo V. Genomic islands and evolution of catabolic pathways in bacteria // Curr. Opin. Biotechnol. 2003. V. 14. P. 248-254.

538. Van Elsas J.D., Fry J., Hirsch P., Molin S. Ecology of plasmid transfer and spread / The horizontal gene pool. Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 2000. P. 175-206.

539. Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P. Recent advances in petroleum microbiology // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2003. V. 67. No. 4. P. 503–549.

540. Van Hamme J.D., Ward O.P. Volatile hydrocarbon biodegradation by a mixed-bacterial culture during growth on crude oil // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 26. №6. P. 356-62.

541. Vatsa P., Sanchez L., Clement C., Baillieul F. Dorey S. Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes // Int. J. Mol. Sci. 2010. V. 11. P. 5095-5108.

542. Venosa A.D., Lee K., Suidan M.T., Garcia-Blanco S., Cobanli S., Moteleb M., Haines J.R., Tremblay G., Hazelwood M. Bioremediation and biorestoration of a crude oil-contaminated freshwater on the St. Lawrence River // Bioremediation J. 2002. V. 6. №3. P. 1-10.

543. Vogel T.M., Gribic-Galic D. Incorporation of oxygen from water into toluene and benzene during anaerobic fermentative transformation // Apl. Environ. Microbiol. 2002. V. 52. P. 200. 202.

544. Vogt C., Richnow H.H. Bioremediation via *in situ* microbial degradation of organic pollutants // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2014. V. 142. P. 123-146.

545. Wakeham S.G., Schaffner C., Giger W. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent lake sediments: I. Compounds having anthropogenic origins. // Geochim. Cosmochim. Acta. 1980, v. 44, N 3, 403-413.

546. Wallace W.H., Sayler G.S. Catabolic plasmids in the environment. // In: Encyclopedia of Microbiology. Lederberg J. (Ed.) Academic Press Inc. 1992. V. 1. P. 417-430.

547. Wang Q., Zhang S., Li Y., Klassen W. Potential Approaches to Improving Biodegradation of Hydrocarbons for Bioremediation of Crude Oil Pollution // Journal of Environmental Protection. 2011. N 2. P. 47-55.

548. Warhurst A.M., Fewson C.A. Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus* // CRC Crit. Rev. Biotechnol.1994. V.14.P. 29-73.

549. Watanabe K., Watanabe K., Kodama Y. Syutsubo K., Harayama S. Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude-oil-storage cavities // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. No 11. P. 4803-4809.

550. Watanabe K., Kodama Yu., Kaku N. Diversity and abundance of bacteria in an anderground oil-storage cavity // BMC Microbiol. 2002. V. 2. No 23. P. 1471-1481.

551. Wayman M., Jenkins A.D., Kormady A.G. Biotechnology for oil and fat industry // J. Am. Oil Chem. Soc. 1984. V. 61. P. 129–131.

552. Weightman A.J., Topping A.W., Hill K.E., Lee L.L., Sakai K., Slater J.H., Thomas A.W. Transposition of DEH, a broad-host-range transposon flanked by IS*Ppu12*, in *Pseudomonas putida* is associated with genomic rearrangements and dehalogenase gene silencing // J. Bacteriol. 2001. V. 184. P. 6581-6591.

553. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991. V. 173. No 2. P. 697-703.

554. Werlen C., Kohler H-P.E., van der Meer J.R. The broad substrate chlorobenzene dioxygenase and cis-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. P51 are linked evolutionarily to the enzymes for benzene and toluene degradation // J. Biol. Chem. 1996. V. 23. P. 4009-4016.

555. Whyte L., Hawari J., Zhou E., Bourbonniere L., Inniss W., Greer Ch. Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V.64. №7. P.2578-2584.

556. Whyte L.G., Bourbonniere L., Bellerose C., Greer C.W. Bioremediation assessment of hydrocarbon-contaminated soils from the High Arctic // Bioremediation J. 1999. V. 3. P. 69-79.

557. Whyte L.G., Goalen B., Hawari J., Labbe D., Greer C.W., Nahir M. Bioremediation treatability assessment of hydrocarbon-contaminated soils from Eureka, Nunavut // Cold Regions Sci. Technol. 2001. V. 32. P. 121-132.

558. Williams P.A., Taylor S.D., Gibb L.E. Loss of the toluene-xylene catabolic genes of TOL plasmid pWWO during growth of *Pseudomonas putida* on benzoate is due to a selective growth advantage of ”cured” segregants // J. Gen. Microbiol. 1988. V. 134. P. 2039-2048.

559. Wilson M.S., Herrick J.B., Jeon Ch.O., Hinman D.E., Madsen E.L. Horizontal transfer of *phnAc* dioxygenase genes within one of two phenotypically and genotypically distinctive naphthalene-degrading guilds from adjacent soil environments // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. № 4. P. 2172-2181.

560. Wongsa P., Tanaka M., Ueno A., Hasanuzzaman M., Yumoto I., Okuyama H. Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serra-tia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil and lubricating oil // Curr. Microbiol. 2004. V. 49. P. 415-422.

561. Worsey M.J., Williams P. A. Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas putida* (arvilla)mt-2; evidence for a new function of the TOL plasmid // J. Bacteriol. 1975. V. 124.P. 7-13.

562. Xue J., Yu Y., Bai Yu., Wang L., Wu Y. Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: a review // Curr. Microbiol. V. 71. N 2. P. 220-228.

563. Yamaguchi M., Sato A.,Yukuyama A. Microbial production of sugar-lipids // Chem. Ind. 1976. V. 4. P. 741-742.

564. Yen K.M., Serdar C.M. Genetic of naphthalene catabolism in pseudomonads // CRC Crit. Rev. Microbiol. 1988. V. 15. P. 1983-1990.

565. Ylihonko K., Hakala J., Niemi J., Lundell J., Mäntsälä P. Isolation and characterization of aclacinomycin A-non-producing *Streptomyces galilaeus* (ATCC 31615) mutants // Microbiol. 1994. V. 140. Pt. 6. P. 1359-1365.

566. Yoon K.P. Stabilities of artificially transconjugated plasmids for the bioremediation of cocontaminated sites // J. Microbiol. 2005. V. 43. P. 196-203.

567. Yu R., Nemati M., Hill G., Haddley J. Mass transfer and bioremediation of naphthalene and methyl naphthalenes in baffled and bead mill bioreactors // Can. J. Chem. Eng. 2006. V. 84. No. 3. P. 349-355.

568. Zhang Y., Miller R.M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant) // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. No 10. P. 3276-3282.

569. Zhu K., Rock C.O. RhlA converts *b*-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the *b*-hydroxydecanoyl-*b*-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol. 2008. V. 190. P. 3147–3154.

570. Zhu X., Amsler C.D., Volz K., Matsumura P. Tyrosine 106 of CheY plays an important role in chemotaxis signal transduction in *Escherichia coli*. // J. Bacteriol. 1996. V. 178. P. 4208-4215.

571. Zhulin I.B., Armitage J.P. Motility, chemotaxis and methylation-independent chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. // J. Bacteriol. 1993. V. 175. No 4. P. 952-958.

572. Zosim Z., Gutnick D. L., Rosenberg E. Properties of hydrocarbon-in-water emulsions stabilized by *Acinetobacter* RAG-1 emulsan // Biotechnol. Bioeng. 1982. V. 24. P. 281–292.

573. Zukerberg A., Diver A., Peeri Z., Gutnick D. L., Rosenberg E. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: chemical and physical properties // Appl. Environ. Microbiol. 1979. V. 37. P. 414–420.

574. Zwick T.C., Foote E.A., Pollack A.J., Boone J.L., Alleman B.C., Hoeppel R.E., Bowling L. Effects of nutrient addition during bioventing of fuel contaminated soils in an arid environment / In: *In-Situ* and *on-Site* bioremediation. Battelle Press, Columbus, OH. 1997. V.1. P. 403-409.

575. Zylstra G.J., Wang X. P., Kim E., Didolcar V.A. Cloning and analysis of the genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation / In: Recombinant DNA technology II. Annals of the New York Academy of Sciences. 1994. V. 721. P. 386-398.

Приложение 1.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2344170

ШТАММ БАКТЕРИЙ PSEUDOMONAS PUTIDA, ПРОДУЦИРУЮЩИЙ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА, ДЛЯ ДЕГРАДАЦИИ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ И УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ

Патентообладатель(ли): ***Филонов Андрей Евгеньевич (RU), Боронин Александр Михайлович (RU)***

Автор(ы): ***см. на обороте***

Заявка № **2006107130**

Приоритет изобретения **10 марта 2006 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации ***20 января 2009 г.***

Срок действия патента истекает **10 марта 2026 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам

Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 344 170** (13) **C2**

(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)
C02F 3/34 (2006.01)
C02F 101/32 (2006.01)
B09C 1/10 (2006.01)
C12R 1/40 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006107130/13, 10.03.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.03.2006

(43) Дата публикации заявки: 20.09.2007

(45) Опубликовано: 20.01.2009 Бюл. № 2

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2122980, 10.12.1998. ПАРФЕНЮК В.Г. и др. Разнообразие микроорганизмов и плазмид биодеградации нафталина, 6-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века», 20-24 мая 2002 найдено online http://www.smu.psn.ru/?id=conf&idl=text&id2=2002/doc-microbio&id3=58. ПАРФЕНЮК В.Г. и др. Генетический контроль деградации (см. прод.)

Адрес для переписки:
142290, Московская обл., г. Пущино, пр. Науки, 5, ИБФМ им. Г.К. Скрябина РАН, А.Е. Филонову

(72) Автор(ы):
Филонов Андрей Евгеньевич (RU),
Кошелева Ирина Адольфовна (RU),
Пунтус Ирина Филипповна (RU),
Ахметов Ленар Имаметдинович (RU),
Боронин Александр Михайлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Филонов Андрей Евгеньевич (RU),
Боронин Александр Михайлович (RU)

(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ PSEUDOMONAS PUTIDA, ПРОДУЦИРУЮЩИЙ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА, ДЛЯ ДЕГРАДАЦИИ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ И УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к очистке объектов окружающей среды от загрязнения полициклическими ароматическими углеводородами и углеводородов нефти. Предложен штамм бактерий Pseudomonas putida ВКМ В-2380Д, продуцирующий поверхностно-активные вещества при росте на полициклических ароматических углеводородах и углеводородах нефти, для деградации полициклических ароматических углеводородов и углеводородов нефти. Штамм Pseudomonas putida ВКМ В-2380Д обладает высокой деструктивной активностью, способен к очистке почв и поверхностных вод от нефтяных загрязнений, содержащих высокие концентрации полициклических ароматических углеводородов в различных климатических условиях. 2 ил., 3 табл.

(56) (продолжение):
ПАУ бактериями рода Pseudomonas, 7-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века», 14-18 апреля 2003, найдено online http://www.smu.psn.ru/?id=conf&idl=text&id2=2003/doc-microbio&id3=64.

RU 2344170 C2

RU 2344170 C2

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2312891

АССОЦИАЦИЯ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ БИОЭМУЛЬГАТОРЫ, ДЛЯ ДЕГРАДАЦИИ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ В ПОЧВАХ, ПРЕСНОЙ И МОРСКОЙ ВОДЕ

Патентообладатель(ли): ***Филонов Андрей Евгеньевич (RU), Боронин Александр Михайлович (RU)***

Автор(ы): ***см. на обороте***

Заявка № **2006107131**

Приоритет изобретения **10 марта 2006 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации ***20 декабря 2007 г.***

Срок действия патента истекает **10 марта 2026 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам

Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 312 891** (13) **C1**

(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)
C02F 3/34 (2006.01)
C02F 101/30 (2006.01)
B09C 1/10 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
C12R 1/38 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006107131/13, 10.03.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.03.2006

(45) Опубликовано: 20.12.2007 Бюл. № 35

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2174496, 10.10.2001. RU 2191643, 27.10.2002. JP 11266858, 05.10.1999.

Адрес для переписки:
142290, Московская обл., г. Пущино, пр. Науки, 5, ИБФМ им. Г.К. Скрябина РАН, А.Е. Филонову

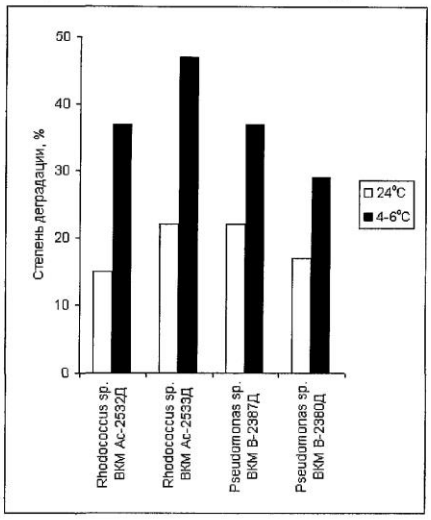
(72) Автор(ы):
Филонов Андрей Евгеньевич (RU),
Кошелева Ирина Адольфовна (RU),
Шкидченко Александр Николаевич (RU),
Пырченкова Ирина Александровна (RU),
Пунтус Ирина Филипповна (RU),
Гафаров Арслан Булатович (RU),
Боронин Александр Михайлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Филонов Андрей Евгеньевич (RU),
Боронин Александр Михайлович (RU)

(54) АССОЦИАЦИЯ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ БИОЭМУЛЬГАТОРЫ, ДЛЯ ДЕГРАДАЦИИ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ В ПОЧВАХ, ПРЕСНОЙ И МОРСКОЙ ВОДЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и может быть использовано при очистке почв, воды и морских акваторий от загрязнения нефтью и нефтепродуктами. Ассоциация штаммов бактерий Rhodococcus sp. ВКМ Ac-2532Д, Rhodococcus sp. ВКМ Ac-2533Д, Pseudomonas sp. ВКМ B-2387Д и Pseudomonas putida ВКМ B-2380Д, продуцирующих биоэмульгаторы, для биодеградации нефти и нефтепродуктов в почвах, пресной и морской воде. Использование ассоциации штаммов позволяет осуществлять деградацию нефти и нефтепродуктов при повышенной концентрации соли как при нормальной, так и при низкой температуре. 1 ил., 2 табл.



RU 2312891 C1

RU 2312891 C1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2378060

БИОПРЕПАРАТ ДЛЯ ОЧИСТКИ ПОЧВ ОТ ЗАГРЯЗНЕНИЙ НЕФТЬЮ И НЕФТЕПРОДУКТАМИ, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

Патентообладатель(ли): ***Филонов Андрей Евгеньевич (RU), Шкидченко Александр Николаевич (RU), Боронин Александр Михайлович (RU)***

Автор(ы): ***см. на обороте***

Заявка № **2007125403**

Приоритет изобретения **05 июля 2007 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации ***10 января 2010 г.***

Срок действия патента истекает **05 июля 2027 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам

Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 378 060** (13) **C2**

(51) МПК
B09C 1/10 (2006.01)
C12N 1/26 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2007125403/13, 05.07.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.07.2007

(43) Дата публикации заявки: 10.01.2009

(45) Опубликовано: 10.01.2010 Бюл. № 1

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2193464 C1, 27.11.2002. ФИЛОНОВ А.Е. и др. Биодеградация нефти психротрофными микроорганизмами-деструкторами и ее адсорбция растительным сорбентом в жидкой минеральной среде, Биотехнология, 2007, №2, с.31-39. СКАЧКОВ С.А. Экспресс-метод характеристики штаммов-нефтедеструкторов, Международная научная конференция, Химия, химическая (см. прод.)

Адрес для переписки:
142290, Московская обл., г. Пущино, пр. Науки, 5, ИБФМ им. Г.К. Скрябина РАН, А.Е. Филонову

(72) Автор(ы):
Филонов Андрей Евгеньевич (RU),
Кошелева Ирина Адольфовна (RU),
Самойленко Владимир Александрович (RU),
Шкидченко Александр Николаевич (RU),
Нечаева Ирина Александровна (RU),
Пунтус Ирина Филипповна (RU),
Гафаров Арслан Булатович (RU),
Якшина Татьяна Васильевна (RU),
Боронин Александр Михайлович (RU),
Петриков Кирилл Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Филонов Андрей Евгеньевич (RU),
Шкидченко Александр Николаевич (RU),
Боронин Александр Михайлович (RU)

RU 2378060 C2

RU 2378060 C2

(54) БИОПРЕПАРАТ ДЛЯ ОЧИСТКИ ПОЧВ ОТ ЗАГРЯЗНЕНИЙ НЕФТЬЮ И НЕФТЕПРОДУКТАМИ, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Биопрепарат содержит биомассу следующих штаммов бактерий: Pseudomonas sp.BKM B-2387Д, Pseudomonas putida BKM B-2380Д, Rhodococcus sp.BKM Ac-2532Д и Rhodococcus sp.BKM Ac-2533Д в равных соотношениях для жидкой формы и сухой формы биопрепарата. Для сухой формы биопрепарата он дополнительно содержит защитную среду при соотношении биомасса: защитная среда, равном 1:(1-1,5). Данный препарат получен путем глубинного культивирования смешанной бактериальной ассоциации штаммов бактерий Pseudomonas sp.BKM B-2387Д, Pseudomonas putida BKM B-2380Д, Rhodococcus sp.BKM Ac-2532Д и Rhodococcus sp.BKM Ac-2533Д на полусинтетической питательной среде. Способ очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами включает внесение рабочего раствора биопрепарата из расчета 10 л/м^2 по п.1 в концентрации 1×10^7-1×10^8 КОЕ/мл и комплексное минеральное удобрение «Нитроаммофоска» в концентрации 20-200 г/м^2. Изобретение позволяет повысить эффективность очистки нефтезагрязненных почв, а именно позволяет произвести эффективную очистку в широком диапазоне температур окружающей среды, а также в условиях засоленности места загрязнения. 3 н. и 2 з.п. ф-лы, 1 табл., 1 ил.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2434059

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СУХОЙ ФОРМЫ БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ ОЧИСТКИ ТЕРРИТОРИЙ ОТ ЗАГРЯЗНЕНИЙ НЕФТЬЮ И НЕФТЕПРОДУКТАМИ

Патентообладатель(ли): ***Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Тульский государственный университет" (ТулГУ) (RU)***

Автор(ы): ***см. на обороте***

Заявка № **2010121688**

Приоритет изобретения **27 мая 2010 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации ***20 ноября 2011 г.***

Срок действия патента истекает **27 мая 2030 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам

Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 434 059** (13) **C1**

(51) МПК
C12N 1/26 (2006.01)
C02F 3/34 (2006.01)
B09C 1/10 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010121688/10, 27.05.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.05.2010

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 27.05.2010

(45) Опубликовано: 20.11.2011 Бюл. № 32

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2378060 C2, 10.01.2010. RU 2143947 C1, 10.01.2000. RU 2138451 C1, 27.09.1999. US 3843517 A, 22.10.1974. SU 1730138 A1, 30.04.1992.

Адрес для переписки:
300600, г.Тула, пр. Ленина, 92,
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Тульский государственный университет" (ТулГУ)

(72) Автор(ы):
Петриков Кирилл Владимирович (RU),
Овчинникова Анастасия Алексеевна (RU),
Ветрова Анна Андрияновна (RU),
Пономарева Ольга Николаевна (RU),
Филонов Андрей Евгеньевич (RU),
Пунтус Ирина Филипповна (RU),
Самойленко Владимир Александрович (RU),
Якшина Татьяна Васильевна (RU),
Боронин Александр Михайлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Тульский государственный университет" (ТулГУ) (RU)

RU 2434059 C1

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СУХОЙ ФОРМЫ БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ ОЧИСТКИ ТЕРРИТОРИЙ ОТ ЗАГРЯЗНЕНИЙ НЕФТЬЮ И НЕФТЕПРОДУКТАМИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии. Предложен способ получения сухой формы биопрепарата на основе микроорганизма-нефтедеструктора рода Pseudomonas или Rhodococcus для очистки территорий от загрязнений нефтью и нефтепродуктами. Культивируют бактерии рода Pseudomonas или Rhodococcus в жидкой питательной среде. Затем суспензию бактерий смешивают с защитной средой. При этом защитную среду готовят на основе 0,05 М натрий-калиевого фосфатного буфера pH 6,8 при следующем соотношении компонентов: 4% полиглюкина, 10% сахарозы, 4% тиомочевины, 2% аскорбиновой кислоты с последующим титрованием 45% раствором гидроксида натрия до pH 6,8-7,2. Полученную смесь добавляют к сорбенту - вспученному перлитовому песку. Затем проводят контактную сушку препарата при t=37°C до постоянной массы. Способ позволяет повысить выживаемость бактериальных клеток микроорганизмов-нефтедеструкторов родов Pseudomonas и Rhodococcus до 44% и 81% соответственно. 1 ил., 2 табл.

RU 2434059 C1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2538404

СПОСОБ АКТИВАЦИИ СУХОЙ ФОРМЫ БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ ОЧИСТКИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ГРУНТОВ

Патентообладатель(ли): ***Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук (ИБФМ РАН) (RU)***

Автор(ы): ***см. на обороте***

Заявка № **2013137367**

Приоритет изобретения **09 августа 2013 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации ***20 ноября 2014 г.***

Срок действия патента истекает **09 августа 2033 г.**

Врио руководителя Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Л.Л. Кирий

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 538 404** (13) **C1**

(51) МПК
B09C 1/10 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2013137367/13, 09.08.2013**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.08.2013

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **09.08.2013**

(45) Опубликовано: **10.01.2015** Бюл. № 1

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: (см. прод.)

Адрес для переписки:
142290, Московская обл., г. Пущино, просп. Науки, 5, ИБФМ РАН, Начальник патентного отдела Сафонова Н.Г.

(72) Автор(ы):
Филонов Андрей Евгеньевич (RU),
Ветрова Анна Андрияновна (RU),
Иванова Анастасия Алексеевна (RU),
Петриков Кирилл Владимирович (RU),
Пунтус Ирина Филипповна (RU),
Боронин Александр Михайлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук (ИБФМ РАН) (RU)

(54) СПОСОБ АКТИВАЦИИ СУХОЙ ФОРМЫ БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ ОЧИСТКИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ГРУНТОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к экологии и биотехнологии. Для активации сухой формы биопрепарата для очистки нефтезагрязненных грунтов готовят водную суспензию с индуктором ферментных систем. В качестве водного раствора для приготовления рабочей суспензии активированного биопрепарата с концентрацией микроорганизмов не менее 5×10^7 КОЕ/мл используют раствор, содержащий 1 г/л триптона, 2,5 г/л глюкозы, 1 г/л дрожжевого экстракта и 1,5 г/л сульфата аммония. В качестве индуктора ферментных систем используют 5 мл/л дизельного топлива. Раствор барботируют при аэрации воздухом 1 л/мин на 1 л раствора в течение 14-18 ч без термостатирования. Изобретение обеспечивает повышение концентрации микроорганизмов в водной суспензии и повышение эффективности деструкции нефти. 1 табл.

(56) (продолжение):
RU 2327649 C2, 27.06.2008; KZ 15316 B, 15.08.2008; CN 102363754 A, 29.02.2012; RU 2193464 C1, 27.11.2002; RU 2104248 C1, 10.02.1998; CN 101851027 A, 06.10.2010; US 2005/0227338 A1, 13.10.2005.

RU 2538404 C1

RU 2538404 C1

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ЭКСПЕРТИЗЫ

(21) Заявка № 2013137367/13(056346) (22) Дата подачи заявки 09.08.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента 09.08.2013

ПРИОРИТЕТ УСТАНОВЛЕН ПО ДАТЕ
(22) подачи заявки 09.08.2013

(72) Автор(ы) Филонов А.Е., Ветрова А.А., Иванова А.А., Петриков К.В., Пунтус И.Ф., Боронин А.М., RU

(73) Патентообладатель(и) Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук (ИБФМ РАН), RU

(54) Название изобретения СПОСОБ АКТИВАЦИИ СУХОЙ ФОРМЫ БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ ОЧИСТКИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ГРУНТОВ

(см. на обороте)

01 1		130307

***ВНИМАНИЕ!** С целью исключения ошибок просьба проверить сведения, приведенные в заключении, т.к. они без изменения будут внесены в Государственный реестр изобретений Российской Федерации, и незамедлительно сообщить об обнаруженных ошибках.*

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

СВИДЕТЕЛЬСТВО

на товарный знак (знак обслуживания)

№ 406008

МикроБак

Правообладатель: ***Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им.Г.К.Скрябина, 142290, Московская область, г.Пущино, пр-кт Науки, 5 (RU)***

Заявка № **2008703757**
Приоритет товарного знака **13 февраля 2008 г.**
Зарегистрировано в Государственном реестре товарных знаков и знаков обслуживания Российской Федерации ***12 апреля 2010 г.***
Срок действия регистрации истекает **13 февраля 2018 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам

Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ (190) **RU** (111) **406008**

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

Товарные знаки, знаки обслуживания и наименования мест происхождения товаров

Товарные знаки, знаки обслуживания

---

(111) *Номер регистрации:* **406008**

(210) *Номер заявки:* **2008703757**

(181) *Дата истечения срока действия регистрации:* **13.02.2018**

(220) *Дата подачи заявки:* **13.02.2008**

Дата приоритета: **13.02.2008**

(151) *Дата регистрации:* **12.04.2010**

(450) *Дата публикации:* **12.05.2010**

(540) *Изображение товарного знака, знака обслуживания*

(732) *Правообладатель:*
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им.Г.К.Скрябина, 142290, Московская область, г. Пущино, пр-кт Науки, 5 (RU)

(750) *Адрес для переписки:*
142290, Московская область, г.Пущино, пр-кт Науки, 5, ИБФМ им.Г.К.Скрябина РАН, патентно-лиц.группа, Л.Г. Беляковой

(526) *Неохраняемые элементы товарного знака:*
Микро, бак.

(591) *Указание цвета или цветового сочетания:*
черный, красный, белый

(511) *Классы МКТУ и перечень товаров и/или услуг:*
01 - микроорганизмы (культуры), за исключением используемых для медицинских и ветеринарных целей; препараты бактериальные; препараты биологические; препараты для регулирования роста растений; препараты из микроорганизмов; препараты из микроорганизмов для очистки почв; препараты ферментативные.

Приложение 2.

Утверждаю	Утверждаю
Генеральный директор ОАО «Тульская Топливно-Энергетическая Компания»	Директор Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН, член-корр. РАН, доктор биологических наук, профессор
_____ В. Г. Ермаков	_____ А. М. Боронин
«6» марта 2008 г.	«04» марта 2008 г.

АКТ ПОЛЕВЫХ ИСПЫТАНИЙ
ОПЫТНОГО ОБРАЗЦА БИОПРЕПАРАТА «МикроБак» ДЛЯ ОЧИСТКИ ПОЧВ ОТ ЗАГРЯЗНЕНИЙ НЕФТЬЮ И НЕФТЕПРОДУКТАМИ

Рождественка – Пущино, 2008

СОДЕРЖАНИЕ

Введение……3
Объекты и методы……..3
Результаты……..4
Заключение……7

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время нефть и нефтепродукты признаны приоритетными загрязнителями окружающей среды. По степени влияния на окружающую среду нефтедобывающие и нефтеперерабатывающие предприятия входят в десятку самых опасных производств (Говорушко, 2003). Почва, обладающая огромной адсорбирующей способностью, аккумулирует в себе большую часть нефтяных загрязнений, при этом изменяются её физические, агрохимические и микробиологические характеристики. В связи с этим необходимы экологически безопасные и экономически обоснованные методы, направленные на интенсификацию процессов биодеградации углеводородов нефти и восстановление плодородия сельскохозяйственных земель. Разработка и совершенствование технологий биоремедиации, особенно почв, загрязнённых нефтью и нефтепродуктами, в настоящее время является приоритетной областью прикладных исследований. Ранее в ИБФМ им. Г. К. Скрябина РАН была получена микробная ассоциация и с её применением проведены эксперименты по деградации нефти в жидкой минеральной среде и в почве в лабораторных и полевых условиях. На основе полученной ассоциации микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти разработан биопрепарат «МикроБак», предназначенный для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами.

Целью данных полевых испытаний была оценка эффективности биоремедиации загрязнённого нефтепродуктами грунта с использованием опытного образца биопрепарата «МикроБак».

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Полевые испытания по очистке грунта, загрязнённого нефтепродуктами, проводились на территории ОАО «Тульская Топливно-Энергетическая Компания» (Тульская область, Киреевский район, д. Рождественка) в осенний период с сентября по ноябрь 2007 года.

Загрязнение грунта происходило во время аварийных разливов нефтепродуктов (газовый конденсат, дизельное топливо, бензин, мазут) и прорывов трубопроводов. Исходный уровень загрязнения составлял 14213 мг/кг грунта (1,4 весовых % остаточных нефтепродуктов). Очистку производили путём интродукции опытного образца биопрепарата «МикроБак», состоящего из природных микроорганизмов-

нефтедеструкторов родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*. Биомассу микроорганизмов наращивали в ферментёре АНКУМ-2М объёмом 10 л с коэффициентом заполнения 0,6-0,7. Для приготовления рабочего раствора биопрепарата 300 мл концентрированной суспензии биопрепарата (с численностью жизнеспособных клеток $2,5\times10^{10}$ КОЕ/мл) вносили в 5 л ёмкость с водопроводной водой. Перемешивание осуществляли до полного исчезновения осадка. Приготовленный рабочий раствор вносили в загрязнённый грунт путем дождевания и рыхления. Одновременно с интродукцией биопрепарата вносили минеральное удобрение «Нитроаммофоска», содержащее источники азота, фосфора и калия. Через 14 суток осуществляли повторное внесение биопрепарата и удобрения, которое сопровождалось рыхлением грунта.

Штаммы, входящие в состав биопрепарата «МикроБак», прошли санитарно-гигиеническую оценку в Научно-Исследовательском Центре Токсикологии и Гигиенической Регламентации Биопрепаратов. В опытах на лабораторных животных были оценены показатели вирулентности, токсичности, токсигенности и диссеминации, на основании чего штаммы были отнесены к 4 классу опасности микроорганизмов (не патогенные) и удовлетворяют требованиям, предъявляемым к промышленным микроорганизмам (Заключения прилагаются).

Эффективность биоремедиации загрязнённого нефтепродуктами грунта оценивали по уменьшению общего содержания углеводородов нефти. Данный анализ проводился по методике измерения массовой доли нефтепродуктов в пробах почв на анализаторе жидкости «Флюорат-02» (ПНД Ф 16.1.21-98) в санитарно-химической лаборатории Федерального государственного учреждения здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии в Тульской области» (протоколы исследования проб прилагаются).

Пробы для химического анализа отбирались каждые две недели в течение сентября - ноября 2007 года.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты проведённых полевых испытаний по очистке грунта, загрязнённого комплексным загрязнителем (дизельное топливо, бензин, газовый конденсат, мазут), представлены в таблицах 1-3. В течение одного месяца содержание остаточных углеводородов нефтепродуктов снизилось на 99,6% за счёт одновременного внесения биопрепарата «МикроБак» и минерального удобрения. В контрольном участке без внесения биопрепарата убыль нефтепродуктов составила 90,7%. Сравнительно небольшая

разница в остаточной концентрации нефтепродуктов опытного участка по сравнению с контрольным связана, во-первых, с физико-химическими свойствами загрязнителя, который в значительной степени был подвержен абиотической деградации за счет испарения и фотоокисления. Во-вторых, результаты микробиологического анализа показали, что численность аборигенной углеводородокисляющей микрофлоры составляла от $8{,}0\times10^4$ до $1{,}8\times10^6$ КОЕ/г грунта. В результате, после двух месяцев степень очистки контрольного участка составляла 99,8%.

Кроме того, на протяжении двух месяцев полевых испытаний проводили мониторинг численности гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов. Из данных таблицы 3 следует, что первоначальное перемешивание грунта на глубине 10-20 см привело к значительному увеличению численности микроорганизмов - на два порядка. Затем происходило незначительное изменение численности микробных популяций, однако численность бактерий в опытном участке была всегда больше, чем в контрольном.

Таблица 1.

Характеристики почвы и воздуха во время полевых испытаний

Дата взятия пробы	Температура воздуха, °С	Температура грунта, °С	pH водной вытяжки грунта	Влажность грунта, %
14 сентября 2007 г.	9	11	7,35	24
28 сентября 2007 г.	22	16	7,11	20
17 октября 2007 г.	15	8	7,41	28
15 ноября 2007 г.	0	0	7,32	30

Таблица 2.

Убыль углеводородов нефтепродуктов.

Дата взятия пробы	Остаточное содержание нефтепродуктов, мг/кг грунта		Степень очистки, %	
	Контрольный участок	Опытный участок	Контрольный участок	Опытный участок
14 сентября 2007 г.	13026±4559	11994±4198	-	-
17 октября 2007 г.	1214±425	52,0±23,4	90,7	99,6
15 ноября 2007 г.	19,6±8,8	18,0±8,1	99,8	99,8

Таблица 3.

Динамика численности микробных популяций.

Дата взятия пробы	Численность гетеротрофных микроорганизмов, КОЕ/г грунта		Численность углеводородокисляющих микроорганизмов, КОЕ/г грунта	
	Контрольный участок	Опытный участок	Контрольный участок	Опытный участок
14 сентября 2007 г.	$2,4\times10^5$		$8,0\times10^4$	
28 сентября 2007 г.	$2,5\times10^7$	$2,0\times10^8$	$1,8\times10^6$	$1,3\times10^7$
17 октября 2007 г.	$1,6\times10^7$	$2,1\times10^8$	$5,1\times10^5$	$1,7\times10^7$
15 ноября 2007 г.	$3,6\times10^7$	$8,8\times10^8$	$9,7\times10^5$	$7,2\times10^7$

КОЕ – число колониеобразующих единиц

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведены полевые испытания эффективности биопрепарата «МикроБак», предназначенного для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами, на территории ОАО «Тульская Топливно-Энергетическая Компания» (Тульская область, Киреевский район, д. Рождественка) в период с сентября по ноябрь 2007 года. Грунт, загрязненный нефтепродуктами (газовый конденсат, дизельное топливо, бензин, мазут) представлял собой смесь песка и глинистой почвы. Исходный уровень загрязнения составлял 14213 мг/кг грунта (1,4 весовых % остаточных нефтепродуктов). Показана эффективность и возможность проведения биоремедиации *in situ* с помощью данного биопрепарата даже при низкой температуре окружающей среды (8-15°С).

Установлено, что через месяц после внесения биопрепарата и минеральных удобрений в опытном участке степень очистки грунта от нефтепродуктов составила 99,6%, при этом степень очистки в контрольном участке была 90,7%. Полученные результаты подтверждены результатами химического и микробиологического анализов.

Таким образом, испытанный биопрепарат может быть рекомендован для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами в регионах с холодным и умеренным климатом.

Главный инженер
ОАО «Тульская Топливно-
Энергетическая Компания» _____ Д. В. Федосеев

Научный руководитель испытаний
старший научный сотрудник, доцент,
кандидат биологических наук _____ А. Е. Филонов

Заведующая санитарно-химической
лабораторией Центра гигиены и
эпидемиологии в Тульской области _____ В. А. Щеглова

Приложение 3.

ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
Россия, 630091 г.Новосибирск
ул.Мичурина, д.12а, офис 401.
ИНН 5406374782/КПП 540601001
ОГРН 1065406168882/ОКПО 98388214
ОКАТО 50401386000/ОКВЭД 71.2
E-mail: Biooil2002@majl.ru Факс: 8-383-231-03-03

Заключение

о проведении испытаний штаммов микроорганизмов, входящих в биопрепарат «МикроБак», ассоциации «ВиО» и «OVF».

В рамках исследовательской работы "Лабораторные и полевые исследования эффективности штаммов микроорганизмов и биопрепаратов для деструкции углеводородов нефти в жидкой минеральной среде и в модельных почвенных системах" были проведены исследования штаммов, входящих в биопрепарат «МикроБак», ассоциации «ВиО» и «OVF» с последующим их испытанием в промышленных условиях на территории нефтедобычи ОАО "Газпромнефть-Ноябрьскнефтегаз" в Пуровском районе Ямало-Ненецкого автономного округа.

Данные микроорганизмы были сравнены со штаммами, входящими в биопрепараты марки «Биоойл». ЗАО «Биоойл» производит и поставляет препараты «Биоойл-СН», «Биоойл-Югра» и «Биоойл-Юг» (ассоциации микроорганизмов — деструкторов нефти) как необходимый микробиологический элемент при рекультивации нефтезагрязнённых земель. По своим характеристикам перечисленные биопрепараты ЗАО «Биоойл» являются одними из лучших в России. Работы по их созданию выполнялись при участии сотрудников ФГУН ГНЦ Вирусологии и Биотехнологии «Вектор» с использованием производственной базы Новосибирского государственного университета.

Сравнение проводилось по следующим параметрам: способность к росту на различных субстратах на агаризованной и жидкой средах, эмульгирующая активность, определение степени деструкции нефти и дизельного топлива, изменение фракционного состава нефти после его разложения микроорганизмами, наличие плазмид, рост микроорганизмов при различных концентрациях нефти и дизельного топлива, рост микроорганизмов при различных температурах.

Подробное описание испытаний приводится в отчете по исследовательской работе "Лабораторные исследования эффективности штаммов микроорганизмов и биопрепаратов для деструкции углеводородов нефти в жидкой минеральной среде и в модельных почвенных системах".

В результате лабораторных сравнительных испытаний в 2007-2008гг. биопрепарата «МикроБак» и ассоциаций «ВиО» и «OVF» с биопрепаратами марки «Биоойл» установлено, что по основным потребительским характеристикам биопрепарат «МикроБак» и ассоциации «ВиО» и «OVF» им не уступают, поэтому было принято решение об их опытном применении на нефтезагрязненных землях ОАО "Газпромнефть-Ноябрьскнефтегаз", очищаемых ЗАО «Биоойл» в рамках хозяйственного договора летом 2008г.

Применение биопрепаратов «МикроБак» и ассоциаций «ВиО» и «OVF» в реальных производственных условиях подтвердило результаты лабораторных сравнительных испытаний, что позволяет рекомендовать их для очистки почвенных и водных экосистем от загрязнений нефтью и нефтепродуктами в регионах с холодным, умеренным и жарким климатом при температурах среды от +2°С до +55°С.

Генеральный директор, к.т.н. **В.А.Забелин**

27 января 2010г.

ОАО «ГАЗПРОМНЕФТЬ-ННГ»

ОТКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ГАЗПРОМНЕФТЬ-НОЯБРЬСКНЕФТЕГАЗ»
(ОАО «Газпромнефть-ННГ»)

629807, Российская Федерация,
Тюменская область, Ямало-Ненецкий автономный округ,
г. Ноябрьск, ул. Ленина, д. 59/87
тел.: +7 (3496) 37-63-68, 35-32-73
факс: +7 (3496) 37-60-20, 37-62-22
http://www.gazprom-neft.ru
ОГРН 1028900703963, ИНН 8905000428

17.05.2010 №02/5/3-13550

на №_____от_____

Заключение
об эффективности микроорганизмов ассоциации «ВиО» при очистке нефтезагрязненных территорий Ямало-Ненецкого автономного округа

Полевые испытания микроорганизмов-нефтедеструкторов ассоциации «ВиО» проводились на территории нефтедобычи ОАО "Газпромнефть-Ноябрьскнефтегаз" в Пуровском районе Ямало-Ненецкого автономного округа совместно с сотрудниками ЗАО «Биоойл» в июне-августе 2008 г. Микробный консорциум «ВиО» был разработан сотрудниками Лаборатории биологии плазмид на базе УРАН Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН и предназначен для ремедиации территорий, загрязненных нефтью и продуктами ее переработки.

Применение ассоциации «ВиО» для ликвидации аварийного разлива нефти продемонстрировало ее высокую эффективность: степень деструкции углеводородов нефти составила 87% через 2 месяца после обработки загрязненного участка почвы площадью 0,826 га. Результаты полевых испытаний свидетельствуют о высокой нефтеокисляющей активности микроорганизмов ассоциации «ВиО», что позволяет рекомендовать их для использования в технологиях рекультивации нефтезагрязненных почв в температурном диапазоне от 0 до 42°С.

С уважением,

начальник управления ОТ, ППБ и ООС **Р.А. Галеев**

Макарчук А.Л.,
8-3496-377266

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
«ГАЗПРОМНЕФТЬ-ВОСТОК»
(ООО «ГАЗПРОМНЕФТЬ-ВОСТОК»)

Россия, 634045, Томск, ул.Мокрушина, д.9, стр.16
Тел: +7 (3822) 58-52-34
Факс: +7 (3822) 55-03-23, 42-89-60
mail: reception@tomsk.gazprom-neft.ru

27.06.07 № 11-03/225-1

на № _____ От _____

Заключение

о результатах лабораторных испытаний микроорганизмов консорциума «ВиО» и биопрепарата «МикроБак»

Консорциум микроорганизмов «ВиО» и биопрепарат «МикроБак» разработаны сотрудниками УРАН Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН для очистки окружающей среды от загрязнений нефтью и нефтепродуктами. Бактерии, входящие в состав биопрепарата «МикроБак», относятся к родам *Pseudomonas* и *Rhodococcus*, способны к деградации углеводородов нефти при низких положительных температурах в присутствии соли (3-5%) и продуцируют поверхностно-активные вещества биологической природы. В состав микробной ассоциации «ВиО» входят 4 культуры углеводородокисляющих микроорганизмов, выделенных из природных экосистем. Основными достоинствами данного бактериального консорциума является способность к деградации высоких концентраций углеводородов нефти и нефтепродуктов (40%) в широком диапазоне температур (2 - 42°С) при кислых значениях pH.

Полученные в ходе лабораторных испытаний результаты анализов почвенных образцов, загрязненных сырой нефтью и обработанных ассоциацией «ВиО» или биопрепаратом «МикроБак», показали существенное снижение содержания углеводородов нефти в модельной почве и составило 58,71% и 51,23 %, соответственно, в течение 6 недель.

Проведенные лабораторные исследования продемонстрировали высокую эффективность деградации нефти консорциумом «ВиО» и биопрепаратом «МикроБак», что позволяет рекомендовать их для биоремедиации нефтезагрязненных территорий в реальных условиях.

Начальник Управления экологической безопасности и рационального природопользования **В.А. Мишин**

Т.42-89-66 (1112)

СибНефть • Восток

Общество с ограниченной ответственностью

Российская Федерация
Юридический адрес:
634034, г. Томск, ул. Мокрушина,9, стр.16
Почтовый адрес:
634041, г. Томск, ул. Енисейская, 26
тел/факс 8 (3822) 55-03-23, 55-03-30

30 января 2007 г. исх.№ 11-03/14-1

Заключение

об эффективности лабораторных испытаний бактерий ассоциации «ВиО»

В состав ассоциации «ВиО» входят бактерии родов *Pseudomonas, Rhodococcus* и *Acinetobacter*. Испытанный микробный консорциум был разработан сотрудниками Лаборатории биологии плазмид УРАН Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН для биоремедиации почвенных и водных экосистем от загрязнений углеводородами нефти. Данная ассоциация была способна к утилизации нефти и нефтепродуктов в широком температурном диапазоне в присутствии соли и при различных значениях pH.

Была проведена оценка эффективности деградации углеводородов нефти консорциумом «ВиО» в ходе лабораторных экспериментов в жидкой минеральной среде, содержащей 15% нефти, при температурах 2 – 4 °С и 24 °С в течение 30 суток. Снижение концентрации углеводородов нефти к концу эксперимента составило 44% и 39%, соответственно.

Результаты проведенных исследований демонстрируют существенное снижение концентрации нефти в системах за счет активности микроорганизмов ассоциации «ВиО», что позволяет рекомендовать данный бактериальный консорциум для очистки окружающей среды от нефти и нефтепродуктов.

Начальник Управления
экологической безопасности
и рационального природопользования В.А. МИШИН

т.42-89-66(1112)

Республика Казахстан, Мангистауская область,
130001 г. Актау, район базы "Казторчермет"
А/я 383 "Казпочта" 14 мкр.

РНН 430 100 25 99 26
тел./факс: 8 (7292) 33 49 39
8 (7292) 33 41 26
e-mail: zapkazplus@mail.ru

АФ ООО "Запказплюс холдинг"

Заключение

об эффективности деградации нефтешламов и буровых шламов бактериями, входящими в состав биопрепаратов «МикроБак», «ВиО» и «ТермоБак»

Биопрепараты «МикроБак», «ВиО» и «ТермоБак», разработанные в Учреждении Российской академии наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН для очистки почвенных и водных экосистем от нефти и нефтепродуктов были предоставлены Актаускому филиалу ООО «Запказплюс Холдинг» в рамках договоров НИР. Сотрудниками Актауского филиала ООО «Запказплюс Холдинг» были проведены полевые испытания по очистке почв, загрязненных нефтешламами и буровыми шламами на территории месторождения «Северные Бузачи» (Казахстан, Мангистауская область) в период июнь – сентябрь 2010 года. Эффективность очистки нефтезагрязненных почв биопрепаратами «МикроБак», «ВиО» и «ТермоБак» составило 60-80%.

Таким образом, можно заключить, что биопрепараты «МикроБак», «ВиО» и «ТермоБак» могут быть рекомендованы для очистки нефтезагрязненных территорий.

Директор Актауского филиала
ООО «Запказплюс холдинг» **И. Мальцев**

Приложение 4.

Приложение 4.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ им. Г. К. СКРЯБИНА

142290, г. Пущино, Московской обл., просп. Науки, д.5, ОКПО 02699702, ОКОНХ 95110
ИНН 5039002150, КПП 503901001 Отделение по г. Пущино УФК по Московской области
(ИНН 5039000146, КПП 503901001, лицевой счет № 06319451110) ОСБ №1554
Р/с 40503810940401000004 в Сбербанке РФ г.Москва, Серпуховское ОСБ№1554,
корр. сч. 30101810400000000225, БИК 044525225,
Телефон: (495) 625-74-48, факс: (495) 632-78-70; INTERNET E-mail BORONIN@IBPM.PUSHCHINO.RU

N 12310/02-1-4-274
На N _____от_____

С В И Д Е Т Е Л Ь С Т В О
о д е п о н и р о в а н и и

Кому Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН
142290, Пущино, Московская обл., проспект Науки, д. 5
(имя депозитора и наименование организации, адрес)

1. Микроорганизм ***Pseudomonas putida*** **BS3961**.
(наименование микроорганизма и опознавательная ссылка, присвоенная депозитором [номер, символ и т.д.])

Регистрационный номер, присвоенный ВКМ **ВКМ B-2380 D**

2. Микроорганизм, поименованный в графе 1, сопровождался Ходатайством о депонировании, включавшем:

научное описание	
таксономическое определение	
научное описание и таксономическое определение	+
справку о непатогенности	

3. Настоящим подтверждается, что микроорганизм, поименованный в графе 1, депонирован Всероссийской коллекцией микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН в связи с подачей заявки на оформление национального патента.

Дата депонирования 21.12.2005.

Заместитель директора Института
Доктор биол.наук, профессор Акименко В.К.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ
им. Г. К. СКРЯБИНА

142290 г.Пущино, Московская обл., просп. Науки, д.5, ОКПО 02699702, ОКОНХ 95110
ИНН 5039000146 КПП 503901001 УФК по Московской области
Отделение по городскому округу Пущино по МО (лицевой счет 06319451110)
Р/с 40503810900001009012 в Отделении 1 Московского ГТУ банка РФ г.Москва 705
БИК 044583001
Телефоны: (495) 625-74-48, факс (495) 632-78-70; INTERNET E-mail BORONIN@IBPM.PUSHCHINO.RU

№ 12310/02-1-4-270

На № _____

СВИДЕТЕЛЬСТВО
о депонировании

Кому Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН
142290, Пущино, Московская обл., проспект Науки, д. 5
(имя депозитора и наименование организации, адрес)

Исправленному на Pseudomonas sp. BS3962 верить с.н.с. к.б.н. отдела ВКМ Акимовой

1. Микроорганизм ***Pseudomonas* sp. BS3962**
(наименование микроорганизма и опознавательная ссылка, присвоенная депозитором [номер, символ и т.д.])

Регистрационный номер, присвоенный ВКМ **ВКМ B-2387 D**

2. Микроорганизм, поименованный в графе 1, сопровождался Ходатайством о депонировании, включавшем:

научное описание	
таксономическое определение	
научное описание и таксономическое определение	+
справку о непатогенности	

3. Настоящим подтверждается, что микроорганизм, поименованный в графе 1, депонирован Всероссийской коллекцией микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН в связи с подачей заявки на оформление национального патента.

Дата депонирования 27.02.2006.

Заместитель директора Института
Доктор биол.наук, профессор Акименко В.К.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ
им. Г. К. Скрябина

142290 г.Пущино, Московской обл., просп. Науки 5, ИНН 5039000146, ОКПО 02699702, ОКОНХ 95110,
Среднерусский банк Сбербанка РФ г.Москва, Серпуховское ОСБ 1554,
р/с 40503810340402000013, БИК 044552323, корр. счет 30101810900000000323
ОАО МАКБ "Возрождение" г.Пущино,
р/с 40503810704200140346, БИК 044525181, корр. счет 30101810900000000181
Телефон: (095) 925-74-48, факс: (095) 956-33-70, INTERNET E-mail
BORONIN@IBPM.SERPUKHOV.SU

_____ **№ 12310** _____

на № _____

СВИДЕТЕЛЬСТВО

о депонировании штамма

1.Кому: **Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН**

лаборатория биологии плазмид

Россия, Московская обл., г. Пущино, 142290, пр. Науки, 5, ИБФМ им. Г.К. Скрябина РАН

Микроорганизм: ***Rhodococcus* sp. штамм X 5**

Регистрационный номер, присвоенный ВКМ: **ВКМ Ac-2532 Д**

2. Микроорганизм, поименованный в графе 1, сопровождался Ходатайством о депонировании, включавшем:

научное описание и таксономическое определение — **представлено**

справку о непатогенности — **нет**

3. Настоящим подтверждается, что микроорганизм, поименованный в графе 1, депонирован Всероссийской коллекцией микроорганизмов ИБФМ РАН. Депонирование проведено с целью патентования микроорганизма в Российской Федерации.

Дата депонирования: 27 февраля 2006 г.

Заместитель директора Института
проф., доктор биологических наук В.К. Акименко

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ
им. Г. К. Скрябина

142290 г.Пущино, Московской обл., просп. Науки 5, ИНН 5039000146, ОКПО 02699702, ОКОНХ 95110,
Среднерусский банк Сбербанка РФ г.Москва, Серпуховское ОСБ 1554,
р/с 40503810340402000013, БИК 044552323, корр. счет 30101810900000000323
ОАО МАКБ "Возрождение" г.Пущино,
р/с 40503810704200140346, БИК 044525181, корр. счет 30101810900000000181
Телефон: (095) 925-74-48, факс: (095) 956-33-70, INTERNET E-mail
BORONIN@IBPM.SERPUKHOV.SU

№ 12310

на № _____

СВИДЕТЕЛЬСТВО

о депонировании штамма

1.Кому: **Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН**
лаборатория биологии плазмид
Россия, Московская обл., г. Пущино, 142290, пр. Науки, 5, ИБФМ им. Г.К. Скрябина РАН

Микроорганизм: ***Rhodococcus*** **sp. штамм S 67**

Регистрационный номер, присвоенный ВКМ: **ВКМ Ac-2533 Д**

2. Микроорганизм, поименованный в графе 1, сопровождался Ходатайством о депонировании, включавшем:

научное описание и таксономическое определение — **представлено**

справку о непатогенности — **нет**

3. Настоящим подтверждается, что микроорганизм, поименованный в графе 1, депонирован Всероссийской коллекцией микроорганизмов ИБФМ РАН. Депонирование проведено с целью патентования микроорганизма в Российской Федерации.

Дата депонирования: 27 февраля 2006 г.

Заместитель директора Института
проф., доктор биологических наук В.К. Акименко

Приложение 5.

НИИ «КОЛЛЕКЦИЯ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ»
ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»

630559, НЦО, Кольцово, ГНЦ ВБ «Вектор», НИИ ККМ
Тел.: +(383-2)366-501, факс: +(383-2)36-74-09
E-mail: repin@vector.nsc.ru

N 0478 24 декабря 2007

СПРАВКА

Коллекция культур микроорганизмов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» приняла на депонирование культуры:

***Acinetobacter baumanni* 7**

Предложена авторами: Овчинникова А.А., Ветрова А.А., Филонов А.Е., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М., Забелин В.А.

Депозиторы: ИБФМ РАН

Принятая культура в НИИ ККМ получила регистрационный номер **В-1072**

***Rhodococcus erythropolis* S26**

Предложена авторами: Ветрова А.А., Овчинникова А.А., Филонов А.Е.

Депозиторы: ИБФМ РАН

Принятая культура в НИИ ККМ получила регистрационный номер **В-1073**

***Pseudomonas putida* F701**

Предложена авторами: Ветрова А.А., Овчинникова А.А., Филонов А.Е.

Депозиторы: ИБФМ РАН

Принятая культура в НИИ ККМ получила регистрационный номер **В-1074**

***Acinetobacter baumanni* 16**

Предложена авторами: Овчинникова А.А., Ветрова А.А., Филонов А.Е., Алексеев А.Ю., Шестопалов А.М., Забелин В.А.

Депозиторы: ИБФМ РАН

Принятая культура в НИИ ККМ получила регистрационный номер **В-1075**

Директор НИИ ККМ **Репин В.Е.**

Приложение 6.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИИ
И ГИГИЕНИЧЕСКОЙ РЕГЛАМЕНТАЦИИ БИОПРЕПАРАТОВ»
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА
(ФГУН НИЦ ТБП ФМБА РОССИИ)

НИЦ ТБП
RCT&HRB

STATE FEDERAL ENTERPRISE FOR SCIENCE
«RESEARCH CENTER FOR TOXICOLOGY AND HYGIENIC
REGULATION OF BIOPREPARATIONS»
AT FEDERAL MEDICO-BIOLOGICAL AGENCY
(SFES RCT& HRB OF FMBA OF RF)

142253 РОССИЯ Московская область Серпуховский р-н о/с Дашковка ул. Ленина 102А
тел./факс (4967) 759738 код из Москвы-27 E-mail:toxic@online.stock.net

102A. Lenin str. Serpukhov, Moscow Region, 142253 Russia
Tel./Fax (4967)759738 code from Moscow-27 E-mail:toxic@online.stock.net

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора по научной работе ФГУН НИЦ ТБП, доктор медицинских наук, профессор

Н.Р. Дядищев

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

о патогенности штамма *Pseudomonas putida* BS3961 (ВКМ В-2380 D) для теплокровных животных

В соответствии с Методическими указаниями Минздрава СССР № 4263-87, № 2620-82 и с учетом рекомендаций ВОЗ (Бюлл. ВОЗ, 1981, № 6, с. 20-27) на беспородных белых крысах и беспородных белых мышах изучены вирулентность, диссеминация, токсичность и токсигенность штамма *Pseudomonas putida* BS3961 (ВКМ В-2380 D).

Вирулентность и диссеминацию штамма изучали при однократном введении суточной агаровой культуры в физиологическом растворе в желудок белым мышам и белым крысам в дозах по 10^6, 10^7, 10^8 и 10^9 и внутрибрюшинно по 10^6, 10^7, 10^8 и 10^9 микробных клеток (мк.кл) на животное. В опыте использовали по 12 животных на дозу (6 самцов и 6 самок). В период наблюдения клинических симптомов заболевания животных не наблюдалось, гибель отсутствовала. Через 30 суток после введения культуры микроорганизмов, животных умерщвляли ингаляцией CO_2 и методом отпечатков делали посев из крови и внутренних органов (легких, печени, почек и селезенки) на чашки Петри с агаризованной средой. Рост культуры в высевах из органов животных при обоих способах введения не обнаружен.

Токсичность штамма оценивали путем внутрибрюшинного введения мышам взвеси агаровой культуры микроорганизмов, приготовленной на стерильном физиологическом растворе и инактивированной нагреванием при 60°С в течение 30 минут в концентрациях 10^7, 10^8 и 10^9 (мк. кл) на животное (по 6 особей на дозу). В течение срока наблюдения – первые двое суток – гибели мышей не было.

Токсигенность штамма изучали на мышах путем внутрибрюшинного и внутрижелудочного введения стерильного фильтрата культуральной жидкости (фильтрация через фильтр Millipor с размером пор 0,22 мкм) 3-х и 7-ми суточных культур в дозах 0,3 мл, 0,6 мл и 1,0 мл (по 6 особей на дозу). Животным контрольных групп вводили стерильную жидкую питательную среду в таких же объемах. Гибели мышей не было. $ЛД_{50}$ не установлена, при обоих способах введения она превышает 1,0 мл на животное для 3-х и 7-ми суточных культуральных жидкостей.

Таким образом, по показателям вирулентности, диссеминации, токсичности и токсигенности штамм *Pseudomonas putida* BS3961 (ВКМ В-2380 D) не патогенен для теплокровных животных и, в соответствии с «Методическими указаниями…» № 2620-82 и № 4263-87, штамм *Pseudomonas putida* BS3961 (ВКМ В-2380 D) относится к 4 классу опасности (малоопасен) и удовлетворяет требованиям, предъявляемым к промышленным микроорганизмам.

Начальник лаборатории санбакконтроля **Негрий Н.В.**

20 ТМО з. 973 т. 2000 – 2006

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИИ
И ГИГИЕНИЧЕСКОЙ РЕГЛАМЕНТАЦИИ БИОПРЕПАРАТОВ»
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА
(ФГУН НИЦ ТБП ФМБА РОССИИ)

НИЦ ТБП
RCT&HRB

STATE FEDERAL ENTERPRISE FOR SCIENCE
«RESEARCH CENTER FOR TOXICOLOGY AND HYGIENIC
REGULATION OF BIOPREPARATIONS»
AT FEDERAL MEDICO-BIOLOGICAL AGENCY
(SFES RCT& HRB OF FMBA OF RF)

142253 РОССИЯ Московская область Серпуховский р-н о/с Дашковка ул. Ленина 102А
тел./факс (4967) 759738 код из Москвы-27 E-mail:toxic@online.stock.net

102A. Lenin str. Serpukhov, Moscow Region, 142253 Russia
Tel./Fax (4967)759738 code from Moscow-27 E-mail:toxic@online.stock.net

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора по научной работе ФГУН НИЦ ТБП, доктор медицинских наук, профессор

Н.Р. Дядищев

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

о патогенности штамма *Rhodococcus* sp. штамм S 67 (ВКМ Ac2533Д) для теплокровных животных

В соответствии с Методическими указаниями Минздрава СССР № 4263-87, № 2620-82 и с учетом рекомендаций ВОЗ (Бюлл. ВОЗ, 1981, № 6, с. 20-27) на беспородных белых крысах и беспородных белых мышах изучены вирулентность, диссеминация, токсичность и токсигенность штамма *Rhodococcus* sp. штамм S 67 (ВКМ Ac2533Д).

Вирулентность и диссеминацию штамма изучали при однократном введении суточной агаровой культуры в физиологическом растворе в желудок белым мышам и белым крысам в дозах по 10^6, 10^7, 10^8 и 10^9 и внутрибрюшинно по 10^6, 10^7, 10^8 и 10^9 микробных клеток (мк.кл) на животное. В опыте использовали по 12 животных на дозу (6 самцов и 6 самок). В период наблюдения клинических симптомов заболевания животных не наблюдалось, гибель отсутствовала. Через 30 суток после введения культуры микроорганизмов, животных умерщвляли ингаляцией CO_2 и методом отпечатков делали посев из крови и внутренних органов (легких, печени, почек и селезенки) на чашки Петри с агаризованной средой. Рост культуры в высевах из органов животных при обоих способах введения не обнаружен.

Токсичность штамма оценивали путем внутрибрюшинного введения мышам взвеси агаровой культуры микроорганизмов, приготовленной на стерильном физиологическом растворе и инактивированной нагреванием при 60°С в течение 30 минут в концентрациях 10^7, 10^8 и 10^9 (мк. кл) на животное (по 6 особей на дозу). В течение срока наблюдения – первые двое суток – гибели мышей не было.

Токсигенность штамма изучали на мышах путем внутрибрюшинного и внутрижелудочного введения стерильного фильтрата культуральной жидкости (фильтрация через фильтр Millipor с размером пор 0,22 мкм) 3-х и 7-ми суточных культур в дозах 0,3 мл, 0,6 мл и 1,0 мл (по 6 особей на дозу). Животным контрольных групп вводили стерильную жидкую питательную среду в таких же объемах. Гибели мышей не было. $ЛД_{50}$ не установлена, при обоих способах введения она превышает 1,0 мл на животное для 3-х и 7-ми суточных культуральных жидкостей.

Таким образом, по показателям вирулентности, диссеминации, токсичности и токсигенности штамм *Rhodococcus* sp. штамм S 67 (ВКМ Ac2533Д) не патогенен для теплокровных животных и, в соответствии с «Методическими указаниями…» № 2620-82 и № 4263-87, штамм *Rhodococcus* sp. штамм S 67 (ВКМ Ac2533Д) относится к 4 классу опасности (малоопасен) и удовлетворяет требованиям, предъявляемым к промышленным микроорганизмам.

Начальник лаборатории санбакконтроля **Негрий Н.В.**

20 ТМО з. 973 т. 2000 – 2006

Приложение 7.

Утверждаю:
Генеральный директор ФГУН ГНЦ ВБ
«Вектор» Роспотребнадзора

И.Г. Дроздов

Отчет об испытании
бактериальной ассоциации «ВиО»

В отделе Изучения и мониторинга зоонозных инфекций и гриппа ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора было проведено первичное испытание бактериальной ассоциации «ВиО», полученной из Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН (Пущино).

Микробный консорциум представляет из себя сухой порошок, в состав которого входят бактерии следующих видов *Acinetobacter baumannii*, *Rhodococcus erythropolis* и *Pseudomonas putida*.

Ассоциация была испытана в соответствии с МУ Минздрава СССР № 4263-67, № 2620-82 и с учетом рекомендаций ВОЗ (бюлл. ВОЗ, 1981, № 6, с. 20-27).

Микробная ассоциация добавлялась в корм белым крысам, беспородным мышам и цыплятам (линия Род-Айленд) на протяжении 1 месяца из расчета 0,01мкг сухого препарата на животное или птицу. В течение месяца проводилось ежедневное термометрирование животных и птиц, визуальный осмотр.

За время наблюдения ни у одного из животных или птиц не было зарегистрировано повышение или понижение температуры, снижения веса. Внешней вид животных нормальный, видимых нарушений пищеварения не наблюдалось.

Таким образом, бактериальная ассоциация «ВиО» не оказывает видимого отрицательного влияния на животных и птиц.

30.06.2010

Зав. отделом, к.б.н. А.М.Шестопалов

Исполнители:

Зав. лаборатории, к.б.н. А.Ю.Алексеев

с.н.с. К.А.Шаршов

Приложение 8.

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

Федеральное государственное учреждение науки
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИИ И ГИГИЕНИЧЕСКОЙ РЕГЛАМЕНТАЦИИ БИОПРЕПАРАТОВ (НИЦ ТБП)

Код **Конфиденциально**

Утверждаю
Директор НИЦ ТБП
профессор

_____ Н.Р.Дядищев
«___» ___11___ 2010г.

Экспертное научно-исследовательское заключение
на материалы досье по токсиколого-гигиенической оценке микробиологического препарата для очистки почвы и воды от нефтяных загрязнений «МикроБак» ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН, Россия.

СЕРПУХОВ - 2010

А. Заявление регистранта

1. Наименование биопрепарата (торговая марка).
   «МикроБак».
2. Заявитель (название, юридический адрес, телефон, факс).
   Учреждение Российской Академии Наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН (ИБФМ РАН), 142290, Московская область, г. Пущино, пр. Науки, 5.
3. Изготовитель (название, юридический адрес, телефон, факс).
   Учреждение Российской Академии Наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН (ИБФМ РАН), 142290, Московская область, г. Пущино, пр. Науки, 5.
4. Поставщик (название, юридический адрес, телефон, факс).
   Учреждение Российской Академии Наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН (ИБФМ РАН), 142290, Московская область, г. Пущино, пр. Науки, 5.
5. Область применения, назначение биопрепарата.
   Защита окружающей среды, ликвидация последствий техногенных катастроф, экологическая биотехнология – очистка почвы и воды от нефтяных загрязнений.
6. Цель токсиколого-гигиенической экспертизы (Государственная регистрация, расширение сферы применения, производство и т.д.).
   Производство препарата для применения в экологической биотехнологии.
7. Наличие документа о качестве и безопасности: токсикологический паспорт, сертификат безопасности, протоколы испытаний продукции и пр.
   Заключение о свойствах штамма *Rhodococcus sp.* ВКМ В-2387Д, В-8380Д (НИЦ ТБП 2006).
   Заключение о свойствах штамма *Pseudomonas putida* ВКМ Ас-2532Д, Ас-2533Д (НИЦ ТБП 2006).
   Патент №2378060 от 05.07.2007 «Биопрепарат для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами, способ его получения и применения».
   Акт полевых испытаний опытного образца биопрепарата «МикроБак» для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами. ОАО Тульская топливно-энергетическая компания. Рождественка-Пущино, 2008.
   Акт о проведении испытаний штаммов микроорганизмов, входящих в биопрепарат «МикроБак», ЗАО Биоойл. Новосибирск, 2010.
   Заключение о результатах лабораторных испытаний микроорганизмов консорциума «ВиО» и биопрепарата «МикроБак». ООО Газпромнефть-Восток, Томск, 2007.
8. Регистрация в других странах (номер регистрационного удостоверения, дата выдачи и срок действия, назначение и регламенты применения).
   Регистрация не проводилась.
9. Нормативные или технические документы на производство биопрепаратов, включая краткое описание технологии.
   Согласно патенту №2378060, проекту ТУ 9291-001-02699702-2010 и технологическому регламенту биопрепарат «МикроБак» представляет собой лиофильно высушенный суспензионный концентрат смеси штаммов, выращенных в условиях ферментера.
   Способ получения бактериальной биомассы нефтеокисляющих микроорганизмов включает следующие стадии:
   - получение рабочей культуры на скошенном агаре;

- приготовление глубинных посевных культур в колбах;
- выращивание нативной культуры в ферментерах;
- концентрирование на проточном сепараторе;
- получение жидкой формы препарата;
- добавление защитных сред, замораживание и сублимационная сушка препарата.

Культивирование штаммов разных видов выполняется в разных ферментерах.

Выращивание нативной культуры псевдомонад (штаммы Pseudomonas sp. ВКМ В-2387Д, Pseudomonas putida ВКМ В-2380Д) осуществляют в ферментере на питательной среде следующего состава:

Кислотный гидролизат казеина или пептон - 10 г/л
Дрожжевой автолизат - 70 г/л
K_2HPO_4 – 2 г/л
$MgSO_4$ - 0,3 г/л
$MnSO_4$ - 0,05 г/л
$(NH_4)_2SO_4$ – 6 г/л
Глюкоза – 20 г/л
Дизельное топливо - 0,5 г/л.

Выращивание нативной культуры родококков (штаммы Rhodococcus sp. ВКМ Ac-2532Д и Rhodococcus sp. ВКМ Ac-2533Д) осуществляют в ферментере на питательной среде следующего состава:

Кислотный гидролизат казеина или пептон – 10 г/л
Дрожжевой автолизат - 100 г/л
K_2HPO_4 – 2 г/л
$MgSO_4$ - 0,3 г/л
$MnSO_4$ - 0,05 г/л
$(NH_4)_2SO_4$ – 6 г/л
NaCl - 0,5 г/л
Глюкоза – 20 г/л
Дизельное топливо 0,5 г/л

Культуральную жидкость сепарируют до концентрированной суспензии. В полученную культуральную суспензию добавляют защитные среды такие как, растворы сахарозы, тиомочевины, полиглюкина при соотношении биомасса: защитная среда, равном 1:1, затем проводится лиофильное высушивание.

Б. Общие сведения

1. Качественный и количественный состав биопрепарата (основные и вспомогательные компоненты).

   Биопрепарат МикроБак представляет собой лиофилизированную биомассу клеток штаммов-деструкторов нефти (п. А9). В качестве защитной среды для сублимационного высушивания используют среды следующего состава:
   - 3-10%-ный раствор сахарозы;
   - 1-3%-ный раствор тиомочевины;
   - 1-2%-ный раствор полиглюкина;
   - 3%-ный раствор тиомочевины +5%-ный раствор сахарозы;
   - 2%-ный раствор тиомочевины +4%-ный раствор сахарозы +2%-ный раствор полиглюкина.

2. Содержание токсичных и опасных веществ:

   2.1. Содержание примесей тяжелых металлов - нет необходимости, т.к. биопрепарат готовится из химически чистых компонентов и сырья пищевого качества.

   2.2. Органических соединений (мг/кг) – нет необходимости, т.к. данный микробиологический биопрепарат производится из компонентов, не содержащих

токсичных органических соединений.

2.3. Бенз/а/пирена (мг/кг): не требуется, т.к. «МикроБак» не относится к биопрепаратам на основе отходов производства и сырья природного происхождения, находящегося в зоне возможного влияния выбросов промышленных предприятий, котельных.

2.4. Радионуклидов естественного и техногенного происхождения (Бк/кг) – нет необходимости, т.к. данный биопрепарат производится из компонентов, не содержащих радиоактивных примесей.

3. Наличие патогенной микрофлоры, в том числе сальмонелл (индекс).
Не допускается.

В. Токсикологическая характеристика биопрепарата

«МикроБак» содержит культуры *Rhodococcus sp.* ВКМ В-2387Д, В-8380Д и *Pseudomonas putida* ВКМ Ас-2532Д, Ас-2533Д. Согласно заключению о свойствах штаммов (Заключения НИЦТБП 2006) штаммы не токсичны, не токсигенны, не вызывают диссеминации во внутренних органах лабораторных животных, соответствуют требованиям, предъявляемым к промышленным микроорганизмам.

В соответствии с ГН 2.2.6.2178-07 ПДК штаммов *Rhodococcus sp.* и *Pseudomonas putida* в воздухе рабочей зоны составляет 50000 КОЕ/куб.м (4 класс опасности – малоопасные). Учитывая совместное присутствие всех штаммов в одном препарате, их общее количество в воздухе рабочей зоны не должно превышать 50000 КОЕ/куб.м.

В составе биопрепарата «МикроБак» токсичных компонентов или примесей сверх допустимых значений не содержится, поэтому токсикологическая характеристика не требуется.

Г. Гигиеническая характеристика биопрепарата

1. Данные о поведении биопрепарата в объектах окружающей среды (почве, воде, воздухе), включая способность к образованию опасных метаболитов.
«МикроБак» не образует опасных метаболитов в объектах окружающей среды.

2. Влияние на качество и пищевую ценность продуктов питания, включая содержание основных элементов биопрепаратов и их примесей (тяжёлые металлы, радионуклиды и др.)
«МикроБак» не применяется в сельском хозяйстве.

3. Рекомендации по безопасному хранению, транспортировке и применению.
«МикроБак» пожаровзрывобезопасен. Транспортирование осуществляется по ГОСТ 28471 «Продукция микробиологическая» автомобильным транспортом в соответствии с правилами перевозки грузов на данном виде транспорта и СанПиН 1.2.2584-10. Транспортные средства должны быть сухими и чистыми. Не допускается совместное транспортирование с продуктами питания. Специально оборудованные транспортные средства не требуются. «МикроБак» в соответствии с ГОСТ 19433-88 «Грузы опасные» относится к неядовитым, неопасным веществам, безопасен для перевозки всеми видами транспорта, в том числе для авиаперевозок.
Хранение предусмотрено в потребительской таре в сухих, чистых, вентилируемых помещениях при комнатной температуре. Следует исключить попадание прямых солнечных лучей.
Применять «МикроБак» следует в соответствии с рекомендациями. При применении необходимо использовать рабочую одежду (халат, фартук) и защитные перчатки, для защиты глаз – защитные очки, соблюдать правила личной гигиены. После работы следует вымыть руки и лицо с мылом.
Освободившуюся тару можно утилизировать с бытовым мусором в отведенных

местах.

Разлитый или рассыпанный биопрепарат собирают и используют по прямому назначению.

К каждой упаковочной единице биопрепарата «МикроБак» должны прилагаться (приклеиваться или наноситься непосредственно на тару) утвержденные рекомендации по его транспортировке, хранению и применению. На каждой упаковочной единице в установленном порядке оформляется тарная этикетка. На тарной этикетке биопрепарата, предназначенного для использования в экологической биотехнологии приводятся следующие сведения и правила личной гигиены: биопрепарат относится к 4 классу опасности (мало опасный продукт). В случае попадания на кожу смыть водой с мылом; при попадании в глаза промыть большим количеством воды, при необходимости – обратиться к врачу.

4. Меры первой помощи при отравлении.

При попадании на кожу – промыть загрязненное место водой с мылом. При попадании в глаза – промыть большим количеством воды. При необходимости обратиться к врачу или доставить пострадавшего в медицинское учреждение (при себе иметь рекомендации по применению биопрепарата).

5. Методы определения токсичных примесей в биопрепарате и в объектах окружающей среды.

Нет необходимости, т.к. биопрепарат не содержит токсичных примесей.

Д. Сведения о технологии применения биопрепарата

1. Рекомендуемые регламенты применения биопрепарата:

Регламент применения МикроБак в экологической биотехнологии.

Очистка почвы.

Механическое удаление нефти или нефтепродуктов с загрязненной поверхности почвы необходимо в случае сильного разлива, когда имеются участки с накоплением не впитавшейся нефти. Это позволит снизить уровень загрязнения до 5-10 вес.%, необходимого для применения микробиологических методов очистки. Рыхление или вспашка почвы (в зависимости от размера загрязненной территории) необходимы для увеличения воздушного объема почвы и улучшения ее структуры.

Для приготовления рабочего раствора 0,1-1 кг концентрированной суспензии ($1,10^{10}$-$1,10^{11}$ КОЕ/мл) биопрепарата вносят при перемешивании в емкость, содержащую 9 л пресной воды. Перемешивание осуществляют до полного исчезновения осадка. Готовый раствор ($1,10^{9}$-$1,10^{10}$ КОЕ/мл) затем переносят в емкость с 900 л пресной воды и перемешивают. Таким образом, рабочий раствор биопрепарата содержит микроорганизмы в концентрации $1,10^{7}$-$1,10^{8}$ КОЕ/мл.

На очищаемую поверхность рабочий раствор наносят из расчета 10 л/м^2. Нанесение в загрязненную среду осуществляют разбрызгиванием или дождеванием с помощью любых машин и средств, предназначенных для этого процесса. Биопрепарат вносят один раз в две недели в течение первого месяца очистки, а затем один раз в месяц до окончания срока проведения работ по очистке почвы. В качестве комплексного минерального удобрения можно использовать, в частности, препарат «Нитроаммофоска», который содержит азот, фосфор и калий. Добавка комплексного удобрения «Нитроаммофоски» позволяет увеличить степень очистки, так как присутствие компонентов биогенного питания - солей азота, фосфора и калия - обеспечивает наилучшие условия роста и окислительной активности бактериальных клеток. Внесение комплексного минерального удобрения осуществляют либо после внесения биопрепарата в сухом виде, либо одновременно путем приготовления водной смеси, содержащей бактериальную суспензию и минеральное удобрение (например, «Нитроаммофоска»). Количество вносимого удобрения определяют после заранее

проведенного химического анализа почвы. При недостаточном содержании азота, фосфора и калия определяют нужное количество комплексного удобрения (из расчета на 1 кв.м загрязненной территории).

Очистка воды.

Механическое удаление нефти или нефтепродуктов необходимо в случае загрязнения поверхности воды более 20%. Это позволит снизить уровень загрязнения до 5-10 вес.%, необходимого для применения микробиологических методов очистки.

Для приготовления рабочего раствора 0,1-1 кг концентрированной суспензии ($1,10^{10}$-$1,10^{11}$ КОЕ/мл) биопрепарата вносят при перемешивании в емкость, содержащую 9 л пресной воды. Перемешивание осуществляют до полного исчезновения осадка. Готовый раствор ($1,10^{9}$-$1,10^{10}$ КОЕ/мл) затем переносят в емкость с 900 л пресной воды и перемешивают. Таким образом, рабочий раствор биопрепарата содержит микроорганизмы в концентрации $1,10^{7}$-$1,10^{8}$ КОЕ/мл.

На очищаемую водную поверхность рабочий раствор наносят из расчета 10 л/кв.м. Нанесение в загрязненную среду осуществляют разбрызгиванием или дождеванием с помощью любых машин и средств, предназначенных для этого процесса. Биопрепарат вносят один раз в две недели в течение первого месяца очистки, а затем еще один раз в месяц до окончания срока проведения работ по очистке воды. В качестве комплексного минерального удобрения можно использовать, в частности, препарат «Нитроаммофоска», который содержит азот, фосфор и калий. Добавка комплексного удобрения «Нитроаммофоски» позволяет увеличить степень очистки, так как присутствие компонентов биогенного питания - солей азота, фосфора и калия - обеспечивает наилучшие условия роста и окислительной активности бактериальных клеток. Внесение комплексного минерального удобрения осуществляют одновременно путем приготовления водной смеси, содержащей бактериальную суспензию и минеральное удобрение (например, «Нитроаммофоска»). Количество вносимого удобрения определяют после заранее проведенного химического анализа воды. При недостаточном содержании азота, фосфора и калия определяют нужное количество комплексного удобрения (из расчета на 1 кв.м загрязненной акватории).

Экспертная комиссия Научно-исследовательского Центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов, рассмотрев материалы токсиколого-гигиенической оценки биопрепарата «МикроБак», считает, что данный биопрепарат может производиться в условиях микробиологического производства и использоваться в экологической биотехнологии для очистки почвы и воды от загрязнений нефтью и нефтепродуктами.

Эксперт, начальник отдела
аэрозольной токсикометрии
кандидат биологических наук — А.В. Воробьёв

Секретарь экспертной комиссии,
кандидат сельскохозяйственных наук — Р.А. Налбандян

Приложение 9.

ОКП 92 9100

Утверждаю
Директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук (ИБФМ РАН), член-корр. РАН, профессор, д.б.н
_____ А.М. Боронин
« 20 » июня 2014 г.

Бактериальный препарат «МикроБак»

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ
ТУ 9291-002-02699702-2014

Срок действия с « 20 » июня 2014 г.

Лаборатория биологии плазмид
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук (ИБФМ РАН), с.н.с., доцент, к.б.н
_____ А.Е. Филонов
« 20 » июня 2014 г.

Охраняется товарным знаком и патентом Российской Федерации
2014 г.

Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии
ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
зарегистрирован каталожный лист
внесен в реестр 16.07.2014
200/116538

Приложение 10.

УТВЕРЖДЕНО
Приказом ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае»
№ 11-Д от 10.02.09 года

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения
«Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае»

«УТВЕРЖДАЮ»
Главный врач федерального бюджетного учреждения здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае»
_____ В.Ю. Ананьев
М.П.

ЭКСПЕРТНОЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ
№0311/7.2-п от 10 октября 2011 года
по результатам санитарно-эпидемиологической экспертизы продукции

Заявитель: Учреждение Российской Академии наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН

Адрес: 142290, Россия, Московская область, г. Пущино, проспект науки 5.
(район, улица, дом)

Изготовитель: Учреждение Российской Академии наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН

Адрес: 142290, Россия, Московская область, г. Пущино, проспект науки 5.

Основание для проведения экспертизы: Заявка вх.№ 0311 от 10.10.2011 г.

Состав экспертных материалов: Заявка; Протокол испытаний № 1816-11 от 05 октября 2011 г., НИИСХ ЦРНЗ «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Центральных районов Нечерноземной зоны». атт.аккр. № РОСС RU.0001.510723; Регистрационные документы, Устав организации; ТУ 9291-001-02699702-2010 «МикроБак».

Установлено: Препарат МикроБак предназначенный для улучшения и восстановления почв, водоемов и акваторий от загрязнений нефтью и нефтепродуктами. Изготовитель Учреждение Российской Академии наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН, 142290, Россия, Московская область, г. Пущино, проспект науки 5.

По результатам проведенных испытаний типового образца – Препарат МикроБак в полимерной упаковке, вместимостью 1000 г – не установлено отклонений от требований: «Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)» утв. решением Комиссии таможенного союза №299 от 28.05.2010г. гл.II. разд. 15.

Заключение:

Препарат МикроБак предназначенный для улучшения и восстановления почв, водоемов и акваторий от загрязнений нефтью и нефтепродуктами, производимый Учреждением Российской Академии наук Институтом биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН, расположенным по адресу: 142290, Россия, Московская область, г. Пущино, проспект науки 5. **соответствует требованиям** «Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)» утв. решением Комиссии таможенного союза №299 от 28.05.2010г. гл. II. разд. 15.

Заведующий санитарно-гигиеническим отделением _____ А.Я. Глушак

Аккредитованная испытательная лаборатория
Научно-исследовательского института сельского хозяйства
Центральных районов Нечерноземной зоны
(НИИСХ ЦРНЗ)
Аттестат аккредитации **№ РОСС RU.0001.510723**
Тел.591-86-28
143026 Московская область, Одинцовский р-н, п/о Немчиновка-1, ул. Агрохимиков,6
Система аккредитации аналитических лабораторий

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ № 1816-11

от "05" октября 2011 г.

1. Наименование продукции — Препарат МикроБак.
2. Поставщик (изготовитель), адрес — Учреждение Российской Академии наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН, Московская область, г. Пущино, проспект науки 5.
3. Предъявитель образцов, заказчик — Учреждение Российской Академии наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН, Московская область, г. Пущино, проспект науки 5.
4. Количество образцов — Образец массой 2 кг
5. Сопроводительный документ — Направление на испытания от 28.09.2011
6. Дата получения образцов — 28.09.2011
7. Время проведения испытаний — с 28.09.2011 по 05.10.2011
8. На соответствие ТУ 9291-001-02699702-2010; Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) утв. решением Комиссии таможенного союза №299 от 28.05.2010 г. гл. II. разд. 15.

Настоящий протокол действителен только на данный образец.
Протокол не может быть скопирован без разрешения испытательной лаборатории

Наименование показателя	НД на методы испытаний	Норма по НД	Результат испытаний
1	2	3	4
Внешний вид, консистенция	ТУ 9291-001-02699702-2010	однородный сыпучий порошок, с мелкокристаллическими включениями	однородный сыпучий порошок, с мелкокристаллическими включениями
Цвет	ТУ 9291-001-02699702-2010	от светло-кремового до желтого, оттенки цвета не регламентируются	светло-кремовый цвет
Запах	ТУ 9291-001-02699702-2010	характерный для данного продукта	характерный для данного продукта
Массовая доля влаги	ГОСТ 26713	не более 10,0 %	8,2 %
Тяжелые металлы и микроэлементы		не более	
Кобальт	ГОСТ Р 50687-94	15,0 мг/кг	1,6
Цинк	МУ – 92*	165,0 мг/кг	16,0
Сера	ГОСТ 26490-85	1180,0 мг/кг	248,2
Свинец	МУ – 92*	32,0 мг/кг	2,3
Кадмий	МУ – 92*	0,5 мг/кг	0,06
Мышьяк	МУ – 93**	2,0 мг/кг	<0,5
Ртуть	МУ – 92*	2,1 мг/кг	<0,01
Радионуклиды:			
Эффективная удельная активность природных радионуклидов ($A_{уд}$)	МУК 2.6.1.1194-03***	370 Бк/кг	< 10
Калий-40		Бк/кг	< 40
Радий-226		Бк/кг	< 3
Торий-232		Бк/кг	< 3
Удельная активность техногенных радионуклидов цезия-137 (Ac_s) и стронция-90 (As_r) = $Ac_s/45 - As_r/30$, отн. ед. не более:	МУК 2.6.1.1194-03***	1,0	< 1
Цезий-137		Бк/кг	ниже пред. обнар. (< 3)
Стронций-90		Бк/кг	ниже пред. обнар. (< 11)

Продолжение протокола № 1816-11

Санитарно-гигиенические показатели:	МУ 2.1.7.730-99		
Патогенные бактерии, в т.ч. сальмонеллы		не доп.	не обнар.
Энтерококки-стрептококки, индекс		1-9 кл./г	не обнар.

Примечание: МУ – 92* Методические указания по определению тяжелых металлов в почвах сельхозугодий и продукции растениеводства. М., 1992.

МУ – 93** Методические указания по определению мышьяка в почвах фотометрическим методов. М., 1993.

МУК 2.6.1.1194-03*** Методика измерения активности радионуклидов с использованием сцинтилляционного бета-гамма- спектрометра с программным обеспечением «Прогресс» ВНИФТРИ, 1996 г.

Руководитель
испытательной лаборатории В.А. Минеева

Приложение 11.

СИСТЕМА СЕРТИФИКАЦИИ ГОСТ Р

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

Добровольная сертификация

СЕРТИФИКАТ СООТВЕТСТВИЯ

№ РОСС RU.АВ80.Н00366

Срок действия с 24.04.2012 **по** 23.04.2015

№ 0541255

ОРГАН ПО СЕРТИФИКАЦИИ рег. № РОСС RU.0001.11АВ80.Общество с ограниченной ответственностью "Центр Сертификации Продукции". 119093, г. Москва, Партийный пер., д. 1, корп. 58, офис 6, тел. (495) 644-48-36, факс (495) 644-48-36.

ПРОДУКЦИЯ Бактериальный препарат «МикроБак», сухая форма.
ТУ 9291-001-02699702-2010.
Серийный выпуск.

код ОК 005 (ОКП):
92 9100

СООТВЕТСТВУЕТ ТРЕБОВАНИЯМ НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ
ГОСТ 20083-74 П. 1.3
ГОСТ Р 51551-2000 П. 4.3

код ТН ВЭД России:

ИЗГОТОВИТЕЛЬ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН. Адрес: 142290 Московская область, г. Пущино, проспект науки 5. Телефон (495) 625-74-48, факс (495) 956-33-70.

СЕРТИФИКАТ ВЫДАН Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН. Адрес: 142290 Московская область, г. Пущино, проспект науки 5. Телефон (495) 625-74-48, факс (495) 956-33-70.

НА ОСНОВАНИИ
Протокола испытаний № 993-21 от 23.04.2012г., выданного Испытательный Центр Сергиево-Посадского филиала ФГУ «Менделеевский ЦСМ», рег. № РОСС RU.0001.21АЮ22, адрес: 141300, г. Сергиев Посад, пр. Красной Армии, д. 212/4

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ Маркирование продукции знаком соответствия. Знак соответствия проставляется на этикетке (упаковке). Дата изготовления, срок годности, условия хранения указаны на упаковке и в товаросопроводительной документации.
Схема сертификации: 3.

М.П.

Руководитель органа _____ А.А.Лебедев
подпись, инициалы, фамилия

Эксперт _____ Б.С. Мигачев
подпись, инициалы, фамилия

Сертификат не применяется при обязательной сертификации

Бланк изготовлен ЗАО "ОПЦИОН" (лицензия № 05-05-09/003 ФНС РФ уровень Б) тел. (495) 726 4742, г. Москва, 2010 г.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность всем сотрудникам ИБФМ им. Г.К. Скрябина РАН, принимавшим участие в данной работе. Отдельная благодарность – Петрухиной В.А. и Стельмашовой Е.В. за помощь в постановке и проведении экспериментов, к.б.н. Ахметову Л.И., к.б.н. Нечаевой И.А., к.б.н. Ветровой А.А., к.б.н. Ивановой А.А., к.х.н. Петрикову К.В., к.б.н. Пунтус И.Ф. и к.б.н. Кошелевой И.А. за многолетнюю и плодотворную совместную работу, всем сотрудникам лаборатории биологии плазмид за внимание и помощь.

Особую благодарность автор приносит своему руководителю и научному консультанту, зав. лабораторией биологии плазмид ИБФМ им. Г.К. Скрябина РАН, чл.-корр. РАН Боронину А.М.