

**ОВЧИННИКОВА АНАСТАСИЯ АЛЕКСЕЕВНА**

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ  
В РИЗОСФЕРЕ И РИЗОПЛАНЕ РАСТЕНИЙ В ПРИСУТСТВИИ  
УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат  
Диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Пушкинском государственном университете на базе лаборатории биологии плазмид Учреждения Российской академии наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, г. Пушкино

Научный руководитель: кандидат биологических наук,  
А.Е. Филонов

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,  
Н. Д. Ананьева

кандидат биологических наук  
Н. С. Захарченко

Ведущая организация: Московский государственный университет,  
биологический факультет, г. Москва

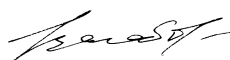
Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2011 г. В \_\_\_\_ часов \_\_\_\_ мин. на заседании Диссертационного совета Д 002.121.01 в Учреждении Российской академии наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН по адресу: 142290, Московская область, г. Пушкино, Проспект науки, 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН.

Автореферат размещён на сайте <http://www.ibpm.ru>  
Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2010 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,  
Доктор биологических наук

В. М. Вагабов



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность**

Добыча нефти является одной из важнейших отраслей промышленности в Российской Федерации. Причем, при ежегодной добыче нефти 400 млн. тонн, объем утечек достигает 15 млн. т/год. Более 75% состава нефти приходится на углеводороды, остальную часть составляют производные углеводородов, в которых содержится сера, азот и кислород. Углеводороды нефти делятся на парафины, циклопарафины (нафтены), ароматические (в том числе и полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), которые являются одними из наиболее токсичных компонентов нефти) и нафтеноароматические углеводороды. ПАУ являются классом повсеместно распространенных устойчивых поллютантов, содержащихся в сточных водах и газовых выбросах коксо-, газо- и нефтехимических производств. Загрязнение почв углеводородами нефти (в том числе и ПАУ) приводит к снижению их плодородия и, соответственно, качества сельскохозяйственной продукции. Одним из перспективных способов решения проблемы загрязнения почв ПАУ и нефтью – разработка методов и подходов их очистки путем биодетоксикации и биоремедиации.

Нефтяные углеводороды подвержены деградации в результате фото- и химического окисления, но основную роль в их разложении играют микроорганизмы. Однако, не существует ни одного вида микроорганизмов, способного деградировать все компоненты сырой нефти, и ее полное разложение требует участия консорциума микроорганизмов-деструкторов различных таксономических групп. Помимо микроорганизмов значительную роль в процессе деградации различных поллютантов, в том числе ПАУ и сырой нефти, играют растения. На сегодняшний день существуют многочисленные экспериментальные данные, наглядно демонстрирующие, что растения обладают целым рядом защитных механизмов, с помощью которых они противостоят токсичному действию чужеродных веществ. К их числу относятся экскреция; конъюгация токсичных соединений с внутриклеточными соединениями с дальнейшей компартментализацией конъюгатов; деградация токсикантов до стандартных клеточных метаболитов и углекислого газа. Основные достоинства фито- и биоремедиации состоят в возможности рекультивации больших территорий, относительно низкой стоимости по сравнению с другими технологиями, высокой эффективности и отсутствии негативного воздействия на окружающую среду. Таким образом, в процессе очистки почвы от нефти и нефтепродуктов, по-видимому, следует сочетать свойства микроорганизмов-деструкторов и растений, ассоциированных с ними.

Работы в направлении фито- и биоремедиации проводятся во многих странах мира, однако взаимодействие составляющих биоремедиационного процесса (микроорганизмы, растения, загрязнитель) к настоящему времени изучены слабо.

### **Цель и задачи исследования**

Целью работы являлось изучение взаимодействия микроорганизмов-деструкторов и его влияния на растения в процессе деградации углеводородов

нефти. Для выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- 1) изучить характер взаимодействия интродуцированных микроорганизмов в процессе биоремедиации модельных систем, загрязненных нафталином и фенантреном;
- 2) изучить влияние микробных взаимодействий на растения в присутствии нафталина и фенантрена;
- 3) оценить хемотаксическую активность штаммов-деструкторов углеводов нефти.
- 4) провести скрининг растений наиболее устойчивых к нефтезагрязнению;
- 5) составить растительно-микробную ассоциацию для эффективной биоремедиации почвы, загрязненной нефтью;
- 6) провести полевые испытания для оценки эффективности деградации нефти созданной микробно-растительной ассоциацией.

### **Научная новизна**

Впервые описан характер взаимодействия штаммов-деструкторов друг с другом в процессе деградации нафталина, фенантрена и нефти в ризосфере и ризоплане растений. Взаимодействие исследованных микроорганизмов-деструкторов рода *Pseudomonas* при совместном культивировании в процессе деградации нафталина проявлялось в конкуренции штаммов *P. putida* KT2442(pNF142::TnMod-OTc) и *P. aureofaciens* BS1393(pNF142::TnMod-OTc) за интермедиат пути деградации – катехол. Взаимодействие исследованных штаммов-деструкторов родов *Pseudomonas* и *Burkholderia* в процессе деградации фенантрена выражалось в кооперации, что проявлялось в потреблении образовавшегося токсичного интермедиата штамма *Burkholderia* sp. BS3702, а именно 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты, штаммом *P. putida* BS3701. Описано влияние загрязнителя и микробного взаимодействия на биометрические характеристики растений. В процессе деградации фенантрена защитный эффект в отношении растений увеличивался при взаимодействии исследованных штаммов-деструкторов родов *Pseudomonas* и *Burkholderia* по сравнению с результатами, полученными при интродукции только одного штамма *Burkholderia* sp. BS3702. В результате конкурентного взаимодействия плазмидосодержащих микроорганизмов-деструкторов рода *Pseudomonas* при совместном культивировании в процессе деградации нафталина наблюдалось снижение защитного эффекта в отношении растений.

### **Научно-практическая значимость**

Созданы растительно-микробные ассоциации («ВиО»- ячмень, «ВиО»-газонная трава) и показана их высокая эффективность в процессе очистки почвы от углеводов нефти. Разработаны практические рекомендации по применению микробно-растительных ассоциаций «ВиО» - ячмень и «ВиО»-газонная трава *in situ* для фиторемедиации почв. В полевых испытаниях на территории нефтяных месторождений Ямало-Ненецкого автономного округа продемонстрирована эффективность предложенной технологии на основе микробно-растительной ассоциации «ВиО»-ячмень в отношении углеводов нефти о чем имеются положительные заключения от ЗАО

«Биоойл» и ООО «Газпромнефть-Ноябрьскнефтегаз». Эффективность очистки составила 89% по сравнению с биопрепаратами ЗАО «Биоойл» (70-75%).

Кроме того, эффективность деградации нефти и нефтепродуктов микробным консорциумом «ВиО» была продемонстрирована в лабораторных испытаниях ООО «Газпромнефть-Восток» и ООО «Сибнефть Восток».

### **Апробация работы**

Материалы диссертации докладывались на 16 конференциях: Биология-наука 21 века, 10-я Пущинская школа-конференция молодых учёных, 17-21 апреля 2006, Пущино; Школа-конференция «Современная биотехнология – защите окружающей среды», 12 сентября, 2006, Пущино; Forth International Conference on Science and Business, 15-18 October, 2007, Pushchino; Школа-семинар «Современные наукоемкие технологии: от идеи к внедрению» 29 октября - 4 ноября, 2007, Белгород; Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», 7 - 11 апреля 2008, Москва; ISTC Workshop at the International Conference on Contamination Soil, ConSoil, Milan, Italy, 3 – 6 June, 2008; XII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 5-9 August 2008, Istanbul; III International Conference on Microbial Diversity, 28 September – 05 October 2008, Perm; Fifth international conference «Science and Training for Biosafety», 6 – 9 October, 2008, Pushchino; Международная школа-конференция, посвященная 40-летию создания ГосНИИгенетика, 21-24 октября, 2008, Москва – Пущино; Биология-наука 21 века, 12-я Пущинская школа-конференция молодых учёных, 10-14 ноября, 2008, Пущино; Российский молодежный инновационный конвент. 9-10 декабря 2008, Москва; Системная биология ПНЦ РАН апрель 2009, Пущино; 3<sup>rd</sup> Congress of European Microbiologists «Microbes and Man – Interdependence and Future Challenges», June 28 – July 2, 2009, Gothenburg, Sweden; Современные биоаналитические системы, методы и технологии. 26-30 октября 2009, Пущино-Тула; ISTC Workshop at the International Conference on Contamination Soil, ConSoil, Austria, 21 – 25 September, 2010; II Тульский молодежный инновационный конвент, 28 октября, 2010, Тула.

### **Публикации по теме диссертации**

По материалам диссертации опубликовано 27 работ, в том числе 7 статей, заявка на получение патента РФ на изобретение и 19 тезисов.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы», «Список литературы» и «Приложение». Работа изложена на 135 страницах машинописного текста, включает 9 таблиц и 42 рисунка. Библиография насчитывает 136 наименований, из них 36 отечественных и 100 зарубежных работ.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В работе использовали 9 штаммов бактерий, выделенных из почвенных образцов, загрязненных нефтепродуктами и отходами химического производства. Штаммы микроорганизмов *Acinetobacter baumannii* 1В и *Acinetobacter baumannii* 7 были любезно предоставлены генеральным директором ЗАО «Биоойл» В.А. Забелиным.

Для культивирования бактерий в качестве минимальной среды использовали среду Эванса (Evans et al., 1970), в качестве полноценных – агаризованные среды Лурия-Бертани (ЛБ) (Sambrook et al., 1989) и Кинга Б (КБ) (King et al., 1954). Для получения агаризованной среды добавляли 2% (вес/объем) агара («Difco», США).

**Кинетику роста на нафталине, салицилате и фенантрене** изучали при выращивании микроорганизмов в колбах со средой Эванса (250 мл). Нафталин и фенантрен вносили в виде пудры (2 г/л и 500 мг/л соответственно), а салицилат в виде 10% раствора (2.5 мл). В качестве инокулята использовали культуры, выращенные на среде ЛБ. Рост микроорганизмов контролировали путем измерения оптической плотности (ОП) и подсчета численности микроорганизмов в культуральной жидкости методом стандартных серийных разведений с последующим высевом на агаризованную среду ЛБ. Удельную максимальную скорость роста ( $\mu_{max}$ ) рассчитывали по стандартной методике (Перт С. Дж., 1978).

**Для определения содержания нафталина, фенантрена, гентизиновой кислоты и 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты** почвенные образцы экстрагировали метанолом, 200 мкл метанольного экстракта анализировали с помощью ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография), используя хроматограф LKB-2150 (Швеция).

**Определение уровня продукции индолил-3-уксусной кислоты (ИУК)** проводили спектрофотометрическим методом (спектрофотометр UV-160A Shimadzu, Япония) путем измерения изменения оптической плотности при добавлении реактива Сальковского.

**Определение активностей ферментов** нафталиндиоксигеназы, салицилатгидроксилазы, катехол-2, 3-диоксигеназы и катехол-1,2-диоксигеназы проводили в бесклеточных экстрактах. Культуры выращивали на минимальной среде с нафталином в качестве источника углерода. Клетки осаждали центрифугированием, дважды отмывали буфером и разрушали на ИБФМ-прессе (Россия). Определение активностей проводили в реакционной смеси при 30°C, по изменению соотношения NAD/NADH, начиная реакцию внесением бесклеточного экстракта, на UV-160A спектрофотометре («Shimadzu», Япония). Белок определяли спектрофотометрически по методу Бредфорд.

**Для определения содержания нефти** почвенные образцы экстрагировали четырёххлористым углеродом и ее остаточную концентрацию измеряли методом ИК-спектрометрии (нефтеанализатор АН-2, Россия).

**Растения для эксперимента выращивали в модельных системах**, представляющих собой пластиковые сосуды со стерильным песком или почвой, растениями (горчица белая, ячмень или газонная трава), загрязнителем и микроорганизмами. Нафталин и фенантрен вносили в виде пудры до конечной концентрации 0.2 мг/г и 0.5 мг/г песка (соответственно) и тщательно перемешивали. Нефть вносили в концентрации 2%. Для обеспечения минерального питания растений использовалась среда "Murashige and skoog basal salt" ("Sigma"). Для эксперимента с нафталином стерильные проростки растений инокулировали в течение 15 мин суспензией штаммов, взятых в экспоненциальной фазе роста (микроорганизмы выращивали в жидкой среде

ЛБ, плотность  $10^8$  КОЕ / мл). Для экспериментов с фенантроном и нефтью микроорганизмы вносили непосредственно в песок/почву в концентрации  $1.5 \times 10^8$  КОЕ/ г песка (почвы), а затем помещали в сосуды стерильные проростки растений.

**Скорость хемотаксической реакции микроорганизмов** оценивали как разницу между количеством клеток в капилляре с аттрактантом (нафталин, фенантрен, дизельное топливо) и в капилляре с фосфатным буфером. Численность микроорганизмов определяли по количеству колоний, выросших на ЛБ-агаре, путем высева содержимого капилляра, концентрацию пересчитывали на 1 мл фосфатного буфера.

**Полевые испытания** проводились на территории Ямало-ненецкого автономного округа, на участках Холмогорского нефтяного месторождения в период июнь-август 2008 г. Уровень начального загрязнения грунта нефтью составлял 15-110 г/кг почвы. Площадь загрязненного участка составляла 0.249 га. Для увеличения доступа кислорода проводили рыхление почвы и увлажнение. Численность вносимых микроорганизмов была порядка  $10^5$  КОЕ/г почвы.

**Для анализа содержания нефтепродуктов** и численности микроорганизмов использовали усредненную пробу. Загрязненную площадь делили на 5 участков, отдельные почвенные образцы отбирались из 10 точек участка (глубина отбора 15-20 см) и помещались в емкости из химически нейтрального материала.

**Тотальную ДНК бактерий** выделяли согласно Ausubel et al., 1999.

**Полимеразную цепную реакцию (ПЦР)** осуществляли в амплификаторе GeneAmp PCR System 2400 ("Perkin-Elmer", США) согласно протоколу фирмы производителя (Dombek P.E. et.al., 2000). Для амплификации гена *nahY* использовали праймеры *nahY1-f* (5`-CTT GAG TAG AGG TCT GGG TG-3`) и *nahY1-r* (5`-CGG TCG CAA TGA GGT T-3`).

**Статистическую обработку** результатов осуществляли с помощью встроенного статистического пакета Excel (MS Office 2007).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **1. Взаимодействие бактерий, стимулирующих рост растений (PGPR) и штаммов-деструкторов в модельных системах, загрязненных нафталином**

Изучение взаимодействия штаммов-деструкторов углеводов нефти проводили в модельных системах. Было показано, что нафталин оказывает значительный фитотоксический эффект на побеги горчицы белой (длина побегов снижалась на 50% по сравнению с положительным контролем) (рис.1).

**Наибольший защитный эффект** от воздействия нафталина на проростки горчицы белой оказывал штамм КТ2442(pM) (где pM – плаزمида биодеградациии нафталина pNF142::TnMod-OTc) (рис.1). В результате его деструктивной активности через 7 дней содержание нафталина в почве снижалось более, чем в два раза (0.095мг/г песка), а длина побегов возрастала на 40% по сравнению с отрицательным контролем (растения с нафталином).

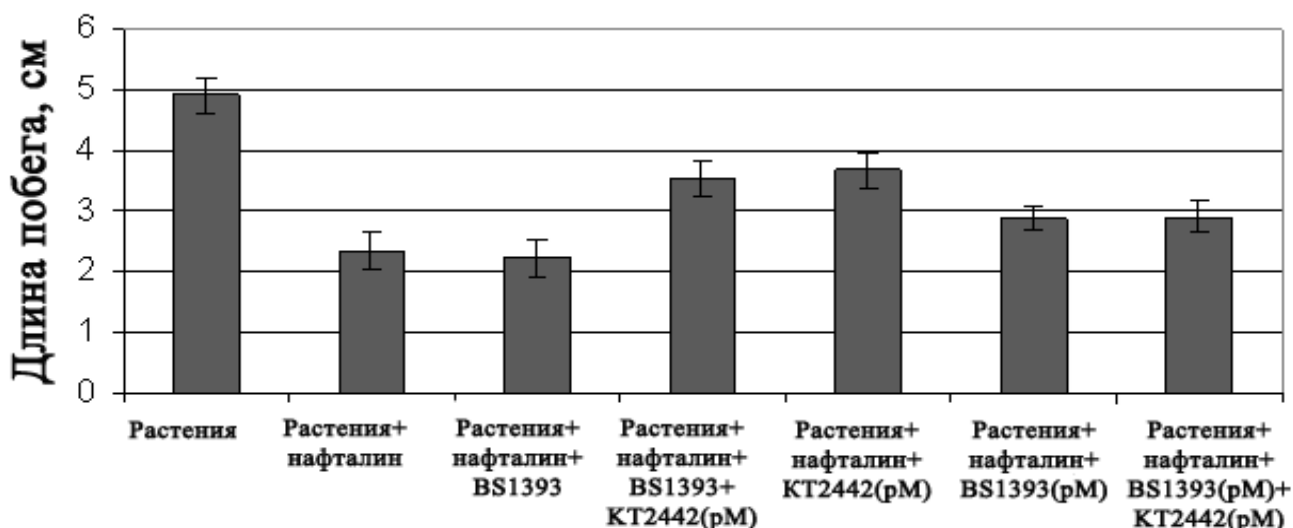


Рис.1. Длина побега растений через 7 дней культивирования

Предполагалось, что при использовании двух плазмидосодержащих штаммов KT2442(pM) и BS1393(pM) должно происходить ускорение потребления нафталина, однако, в системе остаточная концентрация нафталина (0.146 мг/г песка) была выше, чем в случае, когда использовался только один штамм-деструктор KT2442(pM) (0.095мг/г песка) (рис.2), вследствие этого защитный эффект в отношении растений проявлялся в меньшей степени (рис.1).

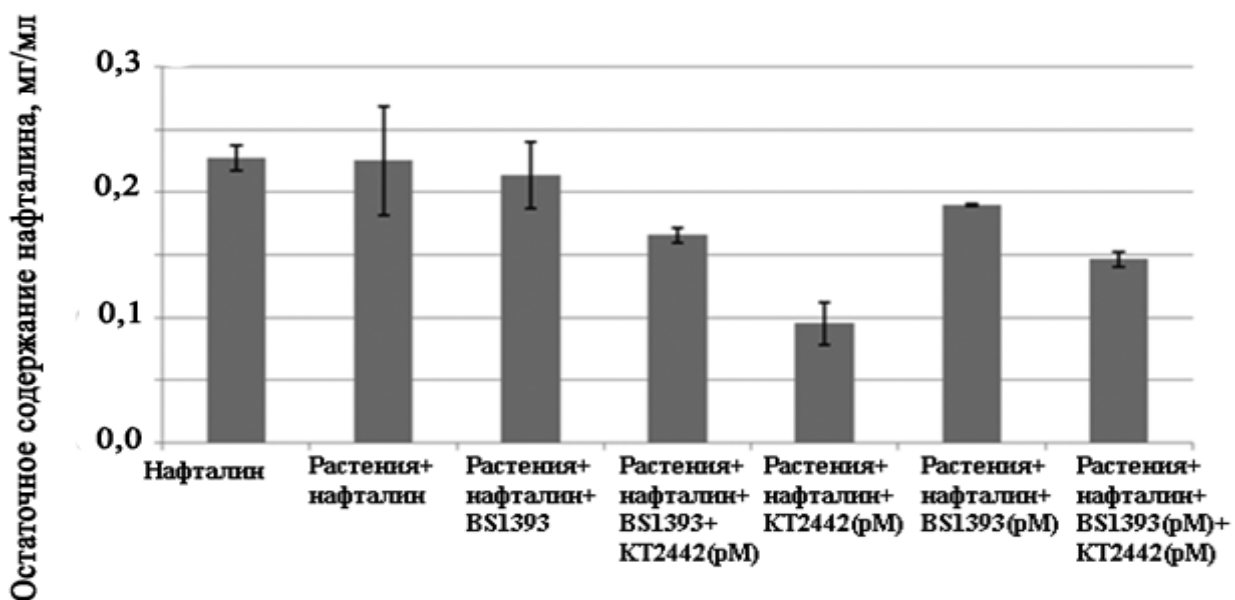


Рис.2. Остаточное содержание нафталина в модельных системах через 7 суток культивирования растений

Для выяснения причины, приводящей к снижению защитного эффекта при использовании двух плазмидосодержащих штаммов и смешанной культуры бесплазмидного BS1393 со штаммом-деструктором нафталина KT2442(pM),



было изучено взаимодействие этих микроорганизмов в прикорневой зоне (ризосфере) и на корнях (ризоплане) растений, а также определены активности ключевых ферментов биодegradации нафталина.

Исследование численности бактерий показало, что она была выше на поверхности корней, чем в прикорневой зоне песка, что может быть обусловлено корневыми экссудатами растений, которые содержат такие питательные вещества как сахара, органические кислоты и аминокислоты.

Эксперименты по изучению динамики **численности** микроорганизмов в **ризоплане** (рис.3) продемонстрировали, что при совместном внесении в модельную систему **без нафталина** штаммов KT2442(pM) и BS1393(pM) колонизирующая способность KT2442(pM) сравнима с колонизирующей способностью плазмидосодержащего BS1393(pM). Это можно объяснить наличием высокой концентрации корневых экссудатов, выделяемых растениями, что может снижать конкуренцию между микроорганизмами.

В случае **одновременного** использования двух плазмидосодержащих штаммов KT2442(pM) и BS1393(pM) в **присутствии нафталина**, в качестве источника углерода и энергии количество BS1393(pM) в **ризоплане** растений (рис.3) была меньше, чем численность этого штамма в модельной системе без KT2442(pM).

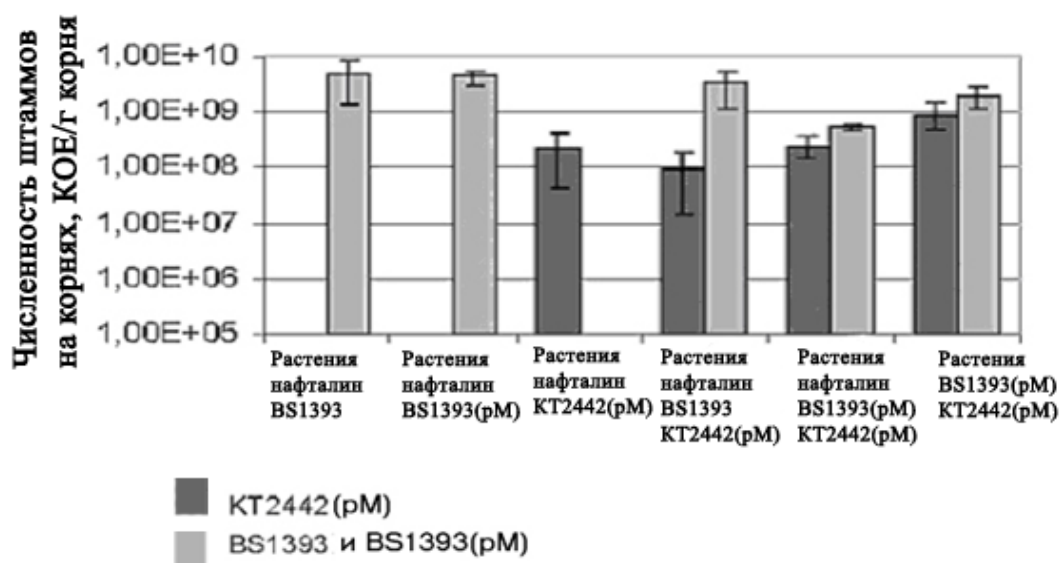


Рис.3. Численность микроорганизмов на корнях горчицы белой через 7 суток культивирования растений (способность к колонизации)

При сравнении **численности** плазмидосодержащих штаммов KT2442(pM) и BS1393(pM) в **ризосфере** в **отсутствии нафталина** (рис.4), численность BS1393(pM) была в 24 раза больше, чем численность KT2442(pM).

При **совместной** интродукции этих микроорганизмов в **ризосфере** наблюдалось снижение численности штамма-деструктора KT2442(pM) по сравнению с опытом, в котором плазмидосодержащий штамм BS1393(pM) отсутствовал (рис.4).

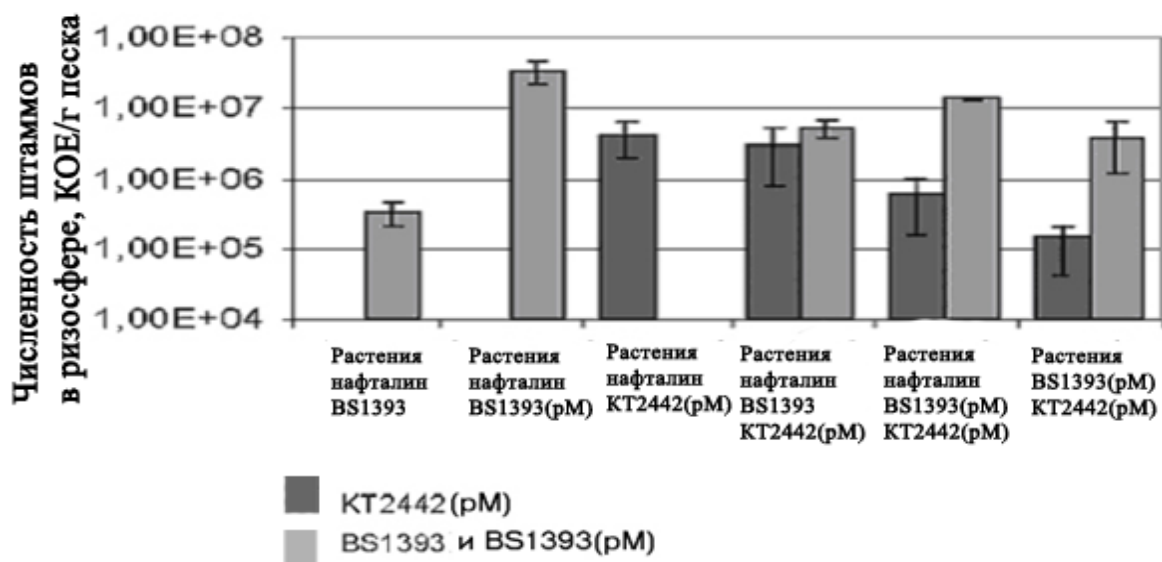


Рис.4. Численность микроорганизмов в ризосфере горчицы белой через 7 суток культивирования растений

Было сделано предположение, что между штаммами KT2442(pM) и BS1393(pM) существуют конкурентные взаимоотношения в ризосфере, по-видимому, из-за использования нафталина в качестве источника углерода. Возможно, что на предполагаемые конкурентные взаимоотношения влияет хемотаксис микроорганизмов в отношении ПАУ.

Как при раздельном, так и при совместном культивировании плазмидосодержащих штаммов (рис.4) **численность в ризосфере** BS1393(pM) была на порядок выше, чем у KT2442(pM) в процессе деградации нафталина. Однако, деградация нафталина в модельной системе, содержащей BS1393(pM) была менее эффективна, чем в модельной системе, содержащей KT2442(pM) или при интродукции обоих микроорганизмов (Рис.2).

Данные эксперимента по определению **скорости хемотаксической реакции** показывают, что плазмидосодержащий штамм BS1393(pM) является в 2.7 раза более активным в отношении нафталина, чем штамм-деструктор KT2442(pM), содержащий ту же плазмиду биодеградации (рис.5).

В модельной системе, содержащей бесплазмидный штамм BS1393, численность микроорганизмов была ниже ( $10^5$  КОЕ/г песка) по сравнению с плазмидосодержащим ( $10^7$  КОЕ/г песка). Возможно, одним из факторов, влияющих на количество микроорганизмов, является хемотаксическая активность в отношении модельного ПАУ. Так, у штамма BS1393 она была слабой ( $2 \cdot 10^6$  КОЕ/ мл  $\times$  час) (Рис. 5), что коррелирует с данными по численности исследованных микроорганизмов в модельных системах.

Из литературных данных известно, что гены хемотаксиса расположены на плаزمиде NAH7, pDTG1, pND6-1 (Ann C.Grimm and Caroline S. Harwood, 1997), обнаруженных в штаммах *Pseudomonas putida*, и на плазмиде pNAH20 штамма *Pseudomonas fluorescens* PC20.

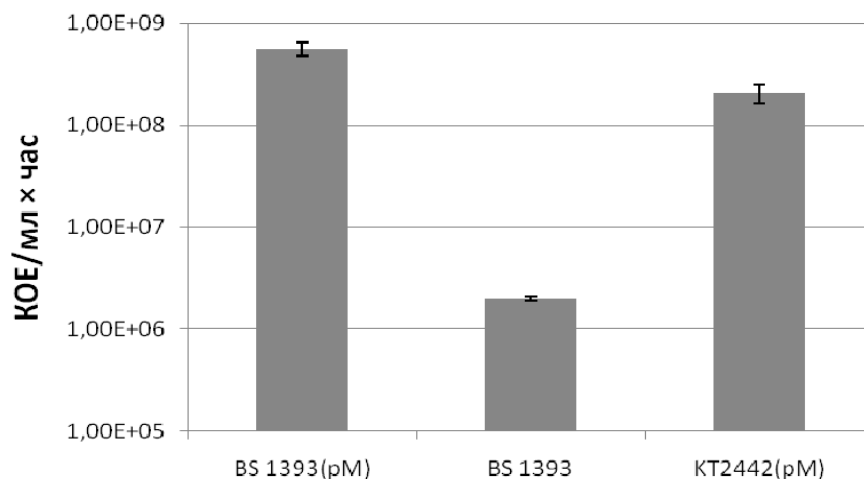


Рис.5. Хемотаксическая реакция микроорганизмов в отношении нафталина

Для идентификации генов хемотаксиса с использованием ПЦР в исследуемых штаммах С. Л. Соколовым были разработаны праймеры, специфичные для гена *nahY*. Результаты ПЦР с данными праймерами показали наличие последовательностей, гомологичных гену *nahY* в штаммах BS1393(pM) и KT2424(pM). В бесплазмидном штамме BS1393 также была обнаружена последовательность, гомологичная гену *nahY* (Рис.6). Однако, на основании более слабого сигнала при ПЦР амплификации можно предположить, что ее гомология с геном *nahY* существенно ниже, чем у плазмидосодержащих штаммов BS1393(pM) и KT2424(pM). Высокая скорость хемотаксиса этих штаммов, а также интенсивный сигнал амплификации с разработанными праймерами, позволяет предположить плазмидную локализацию гена *nahY* в штаммах BS1393(pM) и KT2424(pM).

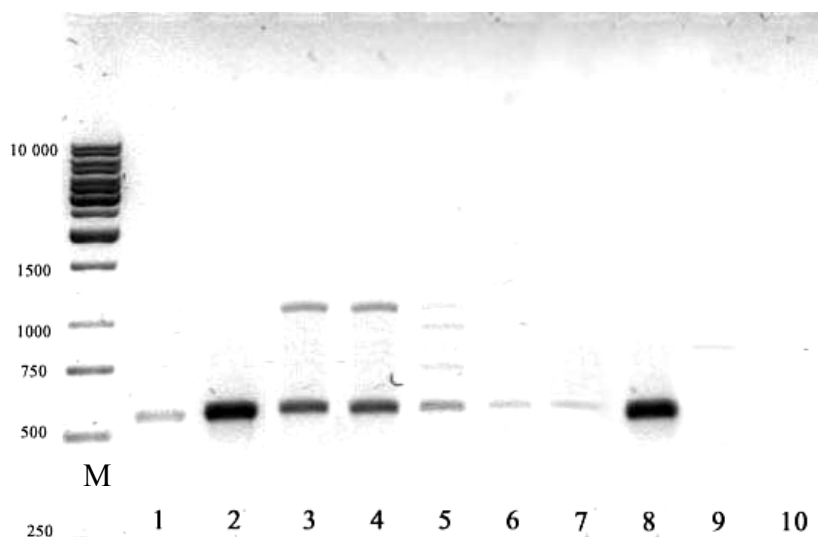


Рис. 6. Электрофореграмма продуктов амплификации гена *nahY* размером 557 п.н. М -1Kb DNA Ladder (Gibco BRL).

1-*Pseudomonas putida* pDTG1; 2- *Pseudomonas aureofaciens* BS1393(pNF142::TnMod-OTc); 3-*Pseudomonas putida* F701; 4- *Pseudomonas putida* BS3701; 5- *Burkholderia* sp. BS3702; 6- *Rhodococcus erythropolis* S26; 7- *Pseudomonas aureofaciens* BS1393; 8- *Pseudomonas putida* KT2442(pNF142::TnMod-OTc); 9- *Acinetobacter baumannii* 16; 10- *Acinetobacter baumannii* 7.

**Изучение конкурентных взаимоотношений** плазмидосодержащих штаммов BS1393(pM) и КТ2442(pM) проводили в условиях периодического культивирования в жидкой минеральной среде с нафталином и салицилатом. Оценивали соотношение численности обоих штаммов. При инокуляции смеси штаммов BS1393(pM) и КТ2442(pM) в концентрации  $10^6$  кл/мл оказалось, что через 10 часов численность штамма КТ2442(pM) в средах с тем и другим источником углерода составляла менее 1% (Рис.7), что дало основание предполагать, что штамм BS1393(pM) был более конкурентоспособным.

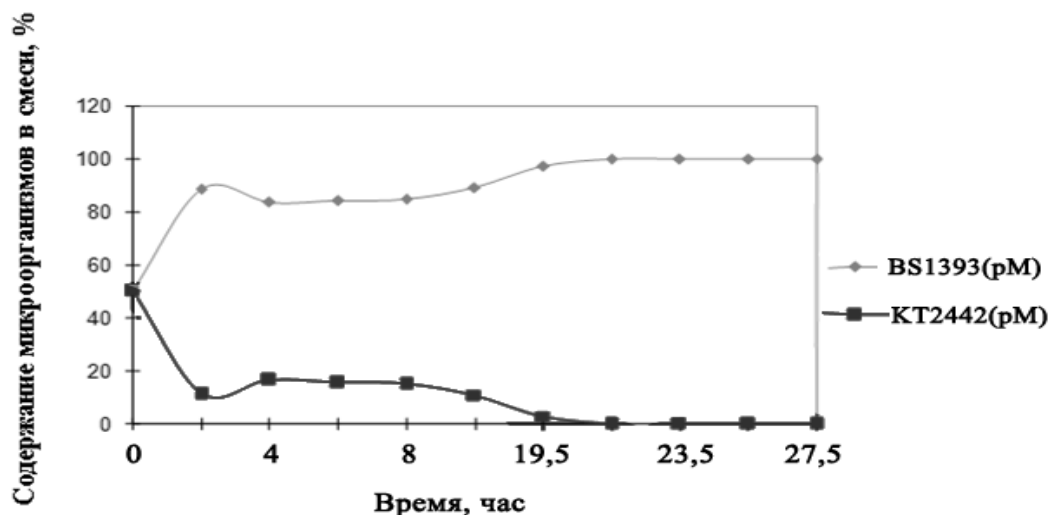


Рис.7. Конкуренция штаммов BS1393(pM) и КТ2442(pM) в условиях периодического культивирования в среде, содержащей нафталин или салицилат

Для объяснения явления конкуренции микроорганизмов были определены **активности ключевых ферментов** деградации нафталина (табл.1). Основные различия отмечены только для катехол-1,2-диоксигеназы. Так, активность этого фермента в штамме BS1393(pM) была в 4 раза выше, чем в КТ2442(pM). Катехол расщепляется катехол-1,2-диоксигеназой до *цис-цис*-муконата, который далее окисляется до сукцинил СоА и ацетил СоА, то есть до интермедиатов цикла Кребса.

Таблица .1. Активности ключевых ферментов деградации нафталина

Штамм	Нафталиндиоксигеназа а, мкМоль/мин х мг белка	Салицилатгидрокси лаза мкМоль/мин х мг белка	Катехол -2,3- диоксигеназа мкМоль/мин х мг белка	Катехол-1,2- диоксигеназа мкМоль/мин х мг белка
КТ2442(pM)	0,031±0,003	0,057±0,003	0,003±0,002	0,027±0,004
BS1393(pM)	0,012±0,002	0,045±0,004	0,002±0,003	0,113±0,002
BS1393	0	0	0	0,155±0,002
КТ2442	0	0	0	0,073±0,003

Ранее было показано, что деградация нафталина включает две стадии. На первой стадии микроорганизмы растут, используя нафталин и разрушая его до некоторых интермедиатов, таких как салицилат и катехол. На последующей

стадии микроорганизмы растут благодаря потреблению соединений, накопленных в результате первой стадии процесса деградации нафталина.

Исходя из данных таблицы 1 по активностям катехол -1,2-диоксигеназы, можно предположить, что при использовании вместе двух плазмидосодержащих штаммов BS1393(pM) и KT2442(pM) последний, в основном, деградирует нафталин до катехола, а BS1393(pM) потребляет быстрее катехол, что и позволяет этому штамму активно развиваться в ризосфере, не давая возможности KT2442(pM) достигать высоких концентраций.

## **2. Взаимодействие штаммов-деструкторов в модельных системах, загрязненных фенантреном**

Как известно, поглощение ПАУ бактериями происходит через водную фазу (Kuiper I., et al.,2004) и, следовательно, зависит от их растворимости в воде. К тому же, сорбция почвенными частицами защищает эти молекулы от деградации микробами и является одной из главных причин их длительной устойчивости в почве. Фенантрен является малорастворимым ПАУ (1.3 мг/л) и, в связи с этим, малодоступным для микроорганизмов.

Ранее в литературе был описан такой способ внесения микроорганизмов в модельные системы, как бактеризация проростков растений (Кравченко Л.В. с соавт., 2004; Игнатова А.А. с соавт.,2006). В наших экспериментах при таком способе интродукции в условиях загрязнения модельных систем фенантреном наблюдался защитный эффект в отношении растений, но деградации слабо сублимирующегося фенантрена практически не происходило. Вероятно, микроорганизмы локализовались на корнях и в ризосфере, тем самым, защищая растения от негативного воздействия ПАУ, а основной объем загрязненного песка не был вовлечен в процесс биодеструкции. В связи с этим штаммы-деструкторы интродуцировали путем непосредственной инокуляции бактериальной суспензии в стерильный песок. Такой способ внесения оказался более эффективным, и были получены данные по деградации фенантрена во всей модельной системе.

Изначально предполагалось, что деградация фенантрена при совместном культивировании штаммов *Pseudomonas putida* BS3701 и *Burkholderia* sp. BS3702 будет проходить эффективнее (Рис. 8), поскольку исходя из опытов на совместимость, эти микроорганизмы не являются антагонистами и имеют разные пути утилизации ПАУ (Балашова Н.В., 2000) Штамм BS3701 деградирует фенантрен с образованием салицилата, который далее окисляется до катехола и затем до интермедиатов цикла Кребса, а штамм BS3702 окисляет салицилат до гентизата, который далее расщепляется до интермедиатов цикла Кребса. Однако при совместном культивировании штаммов деструкция фенантрена была хуже, чем при отдельной интродукции каждого из деструкторов в модельную систему.

При совместной интродукции микроорганизмов, как и при инокуляции системы только BS3701 наблюдался защитный эффект на растения от воздействия фенантрена (рис.9), что выражалось в увеличении длины побега по отношению к отрицательному контролю (с загрязнителем, но без

микроорганизмов). А при использовании BS3702 длина побега была ниже на 33% по сравнению с описанными выше комбинациями.

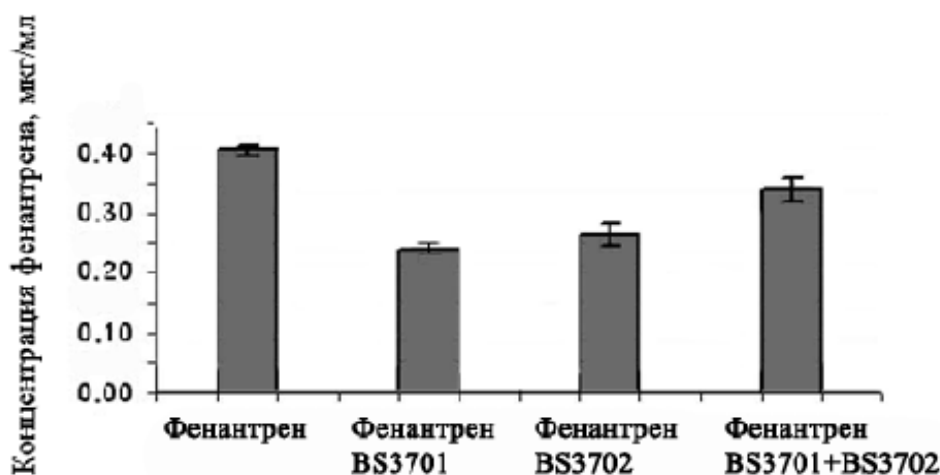


Рис. 8. Остаточная концентрация фенантрена через 7 дней культивирования растений.

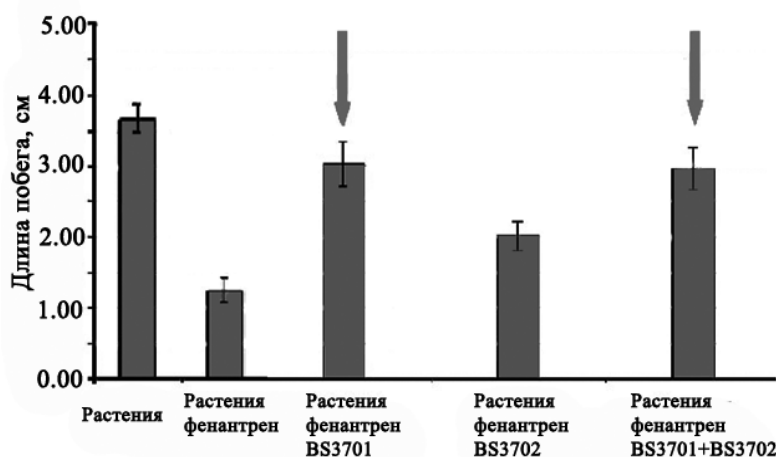


Рис. 9. Длина побега горчицы белой через 7 дней культивирования. Стрелками отмечены варианты с лучшим защитным эффектом

Так как при интродукции BS3702 деградация фенантрена составила 37% (Рис. 8), а защитный эффект на растения был незначительным (рис.9), было сделано предположение, что этот микроорганизм в процессе деградации фенантрена накапливает неизвестное соединение, которое, возможно, является токсичным для растений. А при совместном культивировании BS3701 и BS3702 первый, вероятно, способен потреблять накопленный интермедиат, снимая тем самым токсический эффект, параллельно снижая степень деградации фенантрена (17%), за счет потребления наиболее выгодного субстрата.

**Изучение численности микроорганизмов на корнях и в ризосфере** растений показало, что численность интродуцированных бактерий в ризоплане была на порядок больше. Это, по-видимому, связано с корневой экссудацией растений, что стимулирует микробную активность. Способность эффективно колонизировать корни растений весьма различается у различных штаммов одного рода (Kuiper I., et al.,2004). Также известно, что хемотаксис

микроорганизмов по отношению к некоторым органическим кислотам и аминокислотам, содержащимся в корневых экссудатах, играет важную роль в процессе колонизации (Игнатова, 2005). В наших экспериментах при совместном использовании двух микроорганизмов численность штамма BS3701 возрастала как на корнях, так и **в ризосфере** растений по сравнению с концентрацией этого микроорганизма в системе, интродуцированной монокультурой. Этот факт, возможно, также указывает на наличие в среде субстрата, стимулирующего увеличение численности BS3701.

Данные эксперимента по определению **скорости хемотаксической реакции** в отношении фенантрена показывают, что штамм BS3702 в 13,7 раз был более активным, чем BS3701. Возможно, эти результаты объясняют разницу в данных по численности этих микроорганизмов в ризосфере горчицы белой, где численность BS3702 была на порядок выше, чем численность BS3701.

Для изучения характера взаимодействия штаммов BS3701 и BS3702 было проведено культивирование каждого из этих микроорганизмов и их смешанной культуры (1:1) в жидкой минеральной среде Эванса с фенантrenom в качестве единственного источника углерода и энергии.

Экспоненциальный рост наблюдался на двух участках кривых роста. **При раздельном** культивировании микроорганизмов значение  $\mu_{\max}$  на первом участке была в 5 раз выше, чем на втором у обоих штаммов (0.5 и 0.1 ч<sup>-1</sup> соответственно). **При совместном** культивировании, эти значения на обоих участках для BS3702 были ниже и сравнимы со значениями для BS3701 (1 участок: 0.24 и 0.22 ч<sup>-1</sup>; 2 участок: 0.25 и 0.17 ч<sup>-1</sup> соответственно). Это может быть связано с характером взаимодействия двух штаммов, а именно с выделением интермедиатов одним микроорганизмом и потреблением их другим в качестве более доступных источников углерода.

С целью подтверждения гипотезы о токсичном для растений интермедиате, выделяемом при деградации фенантрена, был проведен анализ образцов культуральной жидкости методом ВЭЖХ. Как было показано ранее (Пунтус И.Ф.с соавт., 1997), одним из основных начальных метаболитов деградации фенантрена штаммами BS3701 и BS3702 является 1-гидрокси-2-нафтойная кислота. В настоящей работе было показано, что при раздельном культивировании этих штаммов, BS3702 продуцирует и накапливает указанный метаболит в больших количествах (14.57 мг/л) по сравнению со штаммом BS3701 (0.11 мг/л). При совместном культивировании этих деструкторов концентрация накопленного 1-гидрокси-2-нафтоата составила всего 0.11 мг/л.

Таким образом, при совместной интродукции BS3701 и BS3702 в условиях загрязнения фенантrenom наблюдались взаимоотношения между микроорганизмами, которые выражались в кооперации, а именно, штамм BS3702 деградировал фенантрен, накапливая в больших количествах интермедиат (1-гидрокси-2-нафтойную кислоту), а BS3701 потреблял 1-гидрокси-2-нафтоат как более доступный субстрат, чем фенантрен.

Проведена оценка токсичности 1-гидрокси-2-нафтоата по отношению к горчице белой. Этот метаболит действительно оказался токсичным для растений, что выражалось в угнетении роста побегов (рис. 10).

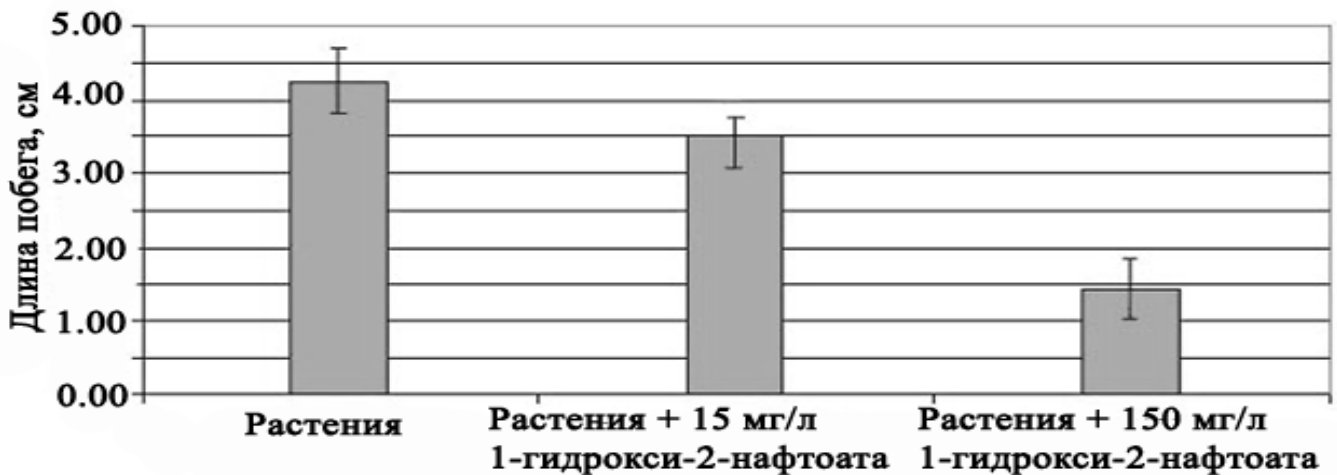


Рис. 10. Влияние разных концентраций 1-гидрокси-2-нафтоата на растения

Обобщая результаты разделов 1 и 2, можно заключить, что в процессе деградации загрязнителя важным аспектом являются взаимодействия микроорганизмов внутри консорциума и влияние их на совместный с растениями процесс ремедиации почвы.

### 3. Создание растительно-микробных ассоциаций для биоремедиации нефтезагрязненных почв

Для разработки эффективных растительно-микробных ассоциаций был проведен скрининг более 20 видов различных растений. В первую очередь, учитывалась устойчивость растений к загрязнению нефтью (2%). В результате наиболее устойчивыми к нефтезагрязнению оказались некоторые бобовые, подсолнечник, кукуруза, ячмень и газонная трава (смесь, основу которой составляет овсяница красная). У всех отобранных растений была развитая корневая система, наибольший объем почвы занимали корни ячменя и газонной травы, которая также имела густую надземную биомассу.

Совместно с сотрудником лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН А.А.Ветровой для разработки 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 наиболее активных микроорганизмов в жидкой минеральной среде с нефтью в качестве единственного источника углерода и энергии. Критериями отбора служили: способность утилизировать углеводороды нефти с концентрацией до 30% загрязнителя при температуре 2-42°C и pH 4-10 в присутствии соли (NaCl), способности микроорганизмов продуцировать биоэмульгаторы и содержание катаболических плазмид в бактериальных клетках. В результате была отобрана микробная ассоциация «ВиО» и в ее состав вошли 4 микроорганизма: *Rhodococcus erythropolis* S26, *Acinetobacter baumannii* 1В, *Acinetobacter baumannii* 7 и *Pseudomonas putida* F701.

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.

#### 4. Оценка эффективности деградации нефти растительно-микробными ассоциациями «ВиО»-ячмень в стерильных и нестерильных модельных почвенных системах

Были проведены лабораторные эксперименты с микробно-растительной ассоциацией «ВиО» - ячмень. Проводили оценку эффективности в отношении деструкции углеводородов нефти при использовании ассоциации растений с каждым из вышеуказанных штаммов, а также растений с целым консорциумом микроорганизмов «ВиО». Эксперимент проводили в стерильных условиях.

Внесение микроорганизмов в модельные системы, загрязненные нефтью и засеянные растениями (ячмень) способствовало детоксикации почвы, что отражалось на **длине побега** по сравнению с отрицательным контролем (растения + нефть без микроорганизмов) (рис.11). Возможно, это связано со способностью бактерий колонизировать корни растений и ризосферу, снижая тем самым токсический эффект нефти за счет своей деградативной активности.

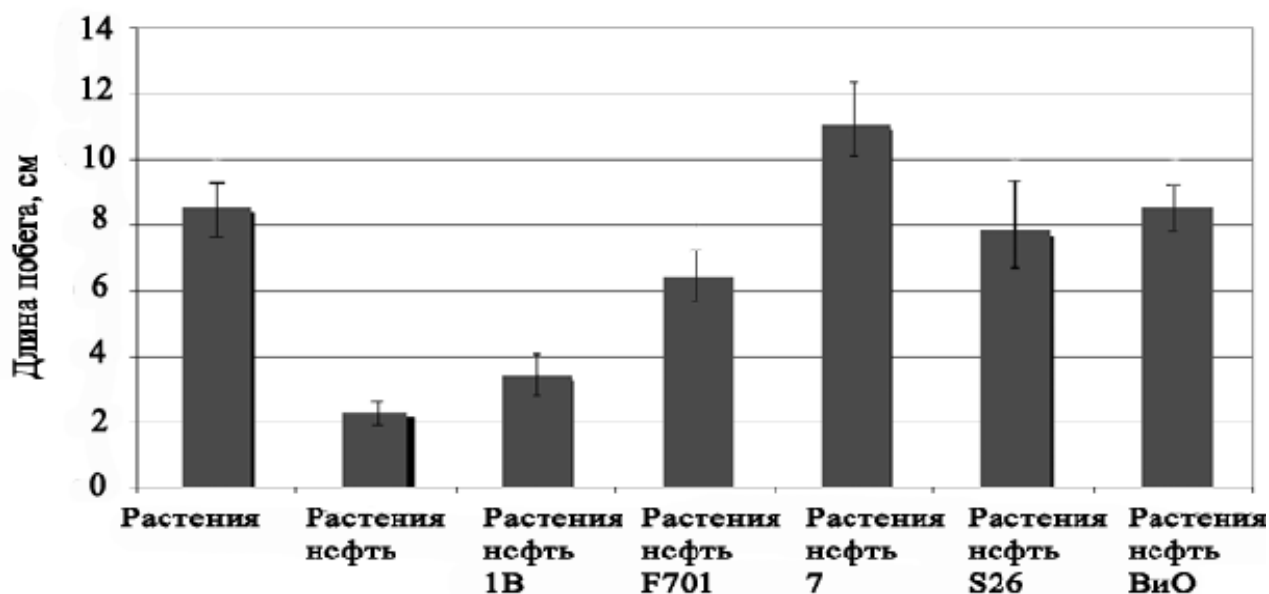


Рис.11. Длина побега растений (ячмень) в стерильном модельном эксперименте через 10 дней культивирования

Численность штаммов на корнях была выше на 1-2 порядка, чем в ризосфере, это связано с выделением корневых экссудатов. Ранее было показано, что при совместном культивировании штаммов родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas* численность родококков снижалась более чем на порядок, при одновременном увеличении численности псевдомонад (Л.М. Барышникова с соавт., 2001). В настоящей работе анализ концентрации каждого из штаммов при совместной инокуляции в составе микробно-растительной ассоциации «ВиО» - ячмень показал, что не происходит существенных изменений в концентрации микробов, по сравнению с концентрацией каждой культуры при отдельной интродукции в модельные системы. Это, возможно, свидетельствует об отсутствии негативных взаимодействий, таких как

конкуренция и аллелопатия. Внесение растений в систему с ассоциацией «ВиО» не изменяло баланса численности штаммов внутри микробного консорциума, что так же свидетельствует об отсутствии отрицательных взаимоотношений между корнями растений и микроорганизмами.

Данные по степени деградации нефти в модельных системах оценивали через 10 суток эксперимента (Рис.12).

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

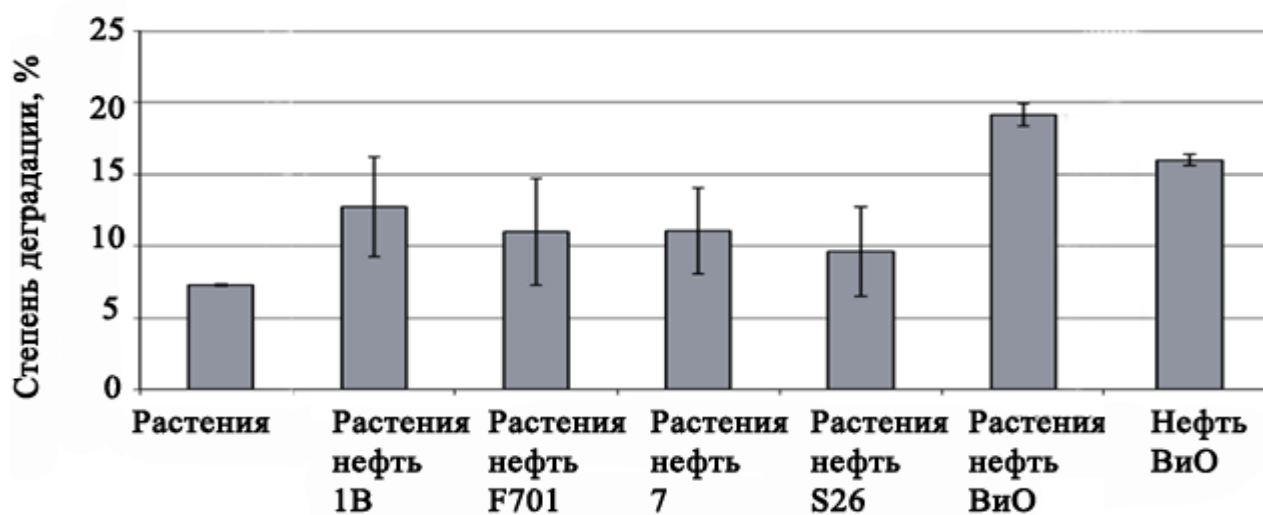


Рис. 12. Убыль нефти в модельных почвенных системах с растительно-микробными ассоциациями «ВиО»-ячмень и составляющими ее штаммами (10 суток)

Возможно, в процессе биodeградации нефти ассоциацией микроорганизмов между бактериями возникала кооперация, в результате которой процесс утилизации углеводов нефти проходил эффективнее. Причем, растения вносили непосредственный вклад в работу растительно-микробных ассоциаций (7%), за счет своих собственных ферментных систем и механизмов детоксикации поллютантов. Ранее отмечалось (Naumann D. et.all. 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 является эффективным инструментом для ремедиации нефтезагрязненных почв, так как внутри ассоциации отсутствуют отрицательные взаимодействия, влияющие на скорость и эффективность утилизации нефти, численность микроорганизмов и развитие растений, ассоциированных со штаммами-деструкторами.

Для оценки необходимости внесения минеральных удобрений в процессе биоремедиации почв растительно-микробной ассоциацией («ВиО»-ячмень) был

проведен лабораторный эксперимент в открытых системах с почвой, загрязненной нефтью с растительно-микробной ассоциацией («ВиО»-ячмень) в присутствии минеральных веществ (нитроаммофоски) и в их отсутствии. Анализ полученных данных показал, что внесение минеральных удобрений не влияло на развитие растений в этих условиях, а интродукция микробов в почву, повышала устойчивость растений в отношении углеводов нефти. Было показано, что бактерии в составе ассоциации «ВиО» не обладают свойствами PGPR – штаммов, то есть выживаемость растений повышалась за счет снижения концентрации загрязнителя.

К концу эксперимента (через 14 суток) все штаммы оставались на достаточно высоком уровне, как в ризосфере, так и на корнях растений. Внесение удобрений не повлияло на изменение численности микроорганизмов в составе растительно-микробной ассоциации. Как известно, минеральные вещества (удобрения), вносимые в почву повышают интенсивность и эффективность физиологических процессов у микроорганизмов, в том числе и процесса биодegradации загрязнителей (Биккинина А.Г. с соавт., 2006). Ранее было показано (Нечаева И.А. с соавт., 2008), что минеральные удобрения влияют на увеличение численности микроорганизмов в почве. В настоящей работе минеральные удобрения стимулировали активность микрофлоры почвы, но не влияли на количество интродуцированных бактерий-деструкторов нефти.

При сравнении степени деградации нефти в модельных системах растения+нефть+«ВиО» было показано, что в стерильных условиях процесс убыли нефти шел эффективнее на 12%. Возможно, вследствие того, что в стерильных модельных системах были созданы практически идеальные условия для растений и ассоциированных с ними микроорганизмов-деструкторов, а именно: в качестве модельной почвы использовали песок, в котором аэрация и движение интродуцированных микроорганизмов происходит значительно лучше, чем в почве; внесение минеральной питательной среды (Murashiga) положительно влияло на рост и развитие растений; также, влажность песка сохранялась на определенном уровне (15%), так как сосуды, в которых проводился опыт, были герметично закрыты. Нестерильный эксперимент был приближен к реальным условиям среды, что возможно и повлияло на скорость снижения концентрации нефти.

#### **5. Изучение эффективности отобранной растительно-микробной ассоциации («ВиО» - газонная трава) в модельных почвенных системах, загрязненных нефтью при различных температурах**

Известно, что большинство нефтяных месторождений РФ расположены в северных регионах, соответственно биоремедиация загрязненных сайтов на таких территориях требует технологии, в которых используют биопрепараты, устойчивые к пониженным температурам и способные сохранять свою активность при данных условиях.

Для сравнительной оценки эффективности в отношении деградации углеводов нефти отселектированной микробно-растительной ассоциацией («ВиО»-газонная трава (Овсяница красная)) был проведен модельный эксперимент при температурах 20°C и 4°C. В процессе эксперимента изучалось взаимодействие микроорганизмов, ассоциированных с растениями (газонная

травы). Оценивали толерантность растений к нефтезагрязнению и к изменению (понижению) температуры окружающей среды.

В процессе эксперимента было показано, что нефть оказывала токсический эффект на растения. Как видно из таблицы 2 с понижением температуры снижалась и длина побегов, а соответственно и устойчивость растений к загрязнителю. Пониженная температура отрицательно влияла на скорость прорастания семян и дальнейший рост растений, в результате длина побега контроля (без нефти и микроорганизмов) при 20°C была выше, чем при 4°C. Ассоциация «ВиО» оказывала защитный эффект на побеги в условиях загрязнения нефтью, однако, микроорганизмы, входящие в состав «ВиО» не обладали PGPR-свойствами, таким образом, интродуцированные бактерии повышали устойчивость растений, видимо, за счет снижения концентрации загрязнителя.

Таблица 2. Длина побега растений при 20°C и 4°C

Модельная система	Длина побега растений через 20 суток, см	
	при 20°C	при 4°C
Растения	14.2±0.6	11.9±0.5
Растения + нефть	6.7±0.5	4.0±0.7
Растения +ВиО	16.2±0.9	12.8±0.8
Растения+нефть+ВиО	8.9±0.5	4.2±0.6

Численность интродуцированных микроорганизмов-деструкторов с понижением температуры снижалась, а штамм 1В полностью элиминировался из системы при температуре 4°C. Так как при температуре 20°C между микроорганизмами-деструкторами в составе ассоциации «ВиО» не наблюдалось взаимодействий отрицательно влияющих на численность штаммов (т.е. концентрации всех микроорганизмов была практически на одном уровне), то можно предположить, что элиминация штамма 1В при 4°C связана, скорее всего с его чувствительностью к пониженной температуре, а не с влиянием трех других микроорганизмов в составе растительно-микробной или микробной ассоциации.

Деградация нефти растительно-микробной ассоциацией («ВиО»-газонная трава) при температуре 4°C проходила менее эффективно, чем при комнатной температуре (Рис. 13). Возможно, это связано со снижением численности концентрации и деградационной активности микроорганизмов в почве модельных систем. При 4°C растения, как и микроорганизмы-деструкторы, становились менее активны в отношении нефти, в результате чего в системе с газонной травой и нефтью, не инокулированной микроорганизмами, уменьшения концентрации загрязнителя не наблюдалось и остаточное количество углеводородов нефти было равно остаточной концентрации нефти в контроле (без микробов и растений).

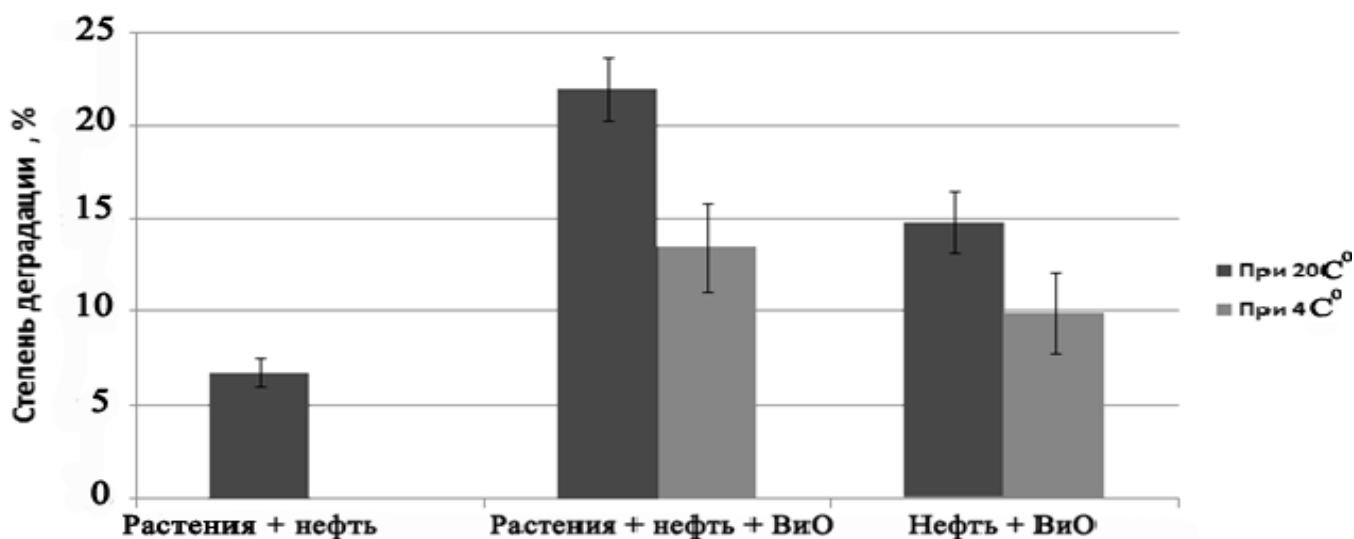


Рис.13. Степень деградации нефти в модельных системах через 20 суток

Так как при 20°C таких явлений не наблюдалось, можно сделать вывод, что отселектированную ассоциацию «ВиО»-газонная трава можно рекомендовать для использования в регионах, где суточная температура в летний период может колебаться от (4- 30°C). В таких условиях растительно-микробная ассоциация способна эффективно деградировать нефть, а при понижении температуры (например, в ночное время) – выживать и сохранять свою активность, таким образом, выдерживая неблагоприятные условия.

Данные эксперимента по определению скорости хемотаксической реакции в отношении дизельного топлива при 20°C и 4°C показывают, что штаммы F701, S26 и 7 имели практически одинаковые значения скоростей при 20°C, а штамм 1В был менее активным (Рис.14). С понижением температуры (при 4°C), активность, в том числе и хемотаксическая падает, что может влиять на численность микроорганизмов. В модельном эксперименте при температуре 4°C штамм 1В полностью элиминировался из системы, можно предположить, что такое резкое уменьшение численности при понижении температуры связано с разницей в скоростях хемотаксической реакции при комнатной и пониженной температурах.

В результате проведенных исследований можно сделать вывод, что отселектированные микробно-растительные ассоциации («ВиО»-ячмень и «ВиО»-газонная трава) обладают высокой эффективностью в отношении деградации нефти, и могут быть рекомендованы для использования в открытой окружающей среде для устранения аварийных последствий.

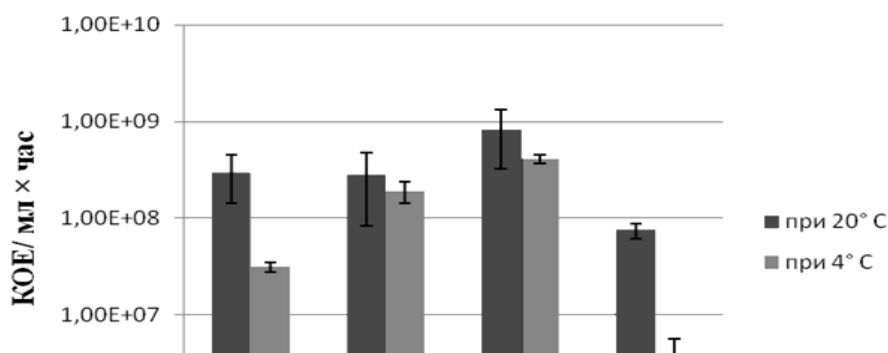


Рис.14. Скорость хемотаксической реакции штаммов, входящих в состав ассоциации «ВиО» в отношении дизельного топлива при температурах 20°C и 4°C

### 6. Оценка эффективности биоремедиации почвы растительно-микробной ассоциацией «ВиО»-ячмень в условиях реального разлива нефти

С целью оценки эффективности отселектированной 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°C при среднесуточной температуре воздуха 11°C.

Наилучший защитный эффект на побеги ячменя оказывали микроорганизмы, входящие в состав ассоциации «ВиО» и биопрепарата «Биоойл-Югра».

Как показывает рис.15 на участке, обработанном ассоциацией «ВиО», степень деструкции была самая высокая (89%), по сравнению с двумя другими биопрепаратами (70-75%), причем, что особенно важно, максимум был достигнут в течение первого месяца после интродукции микроорганизмов.

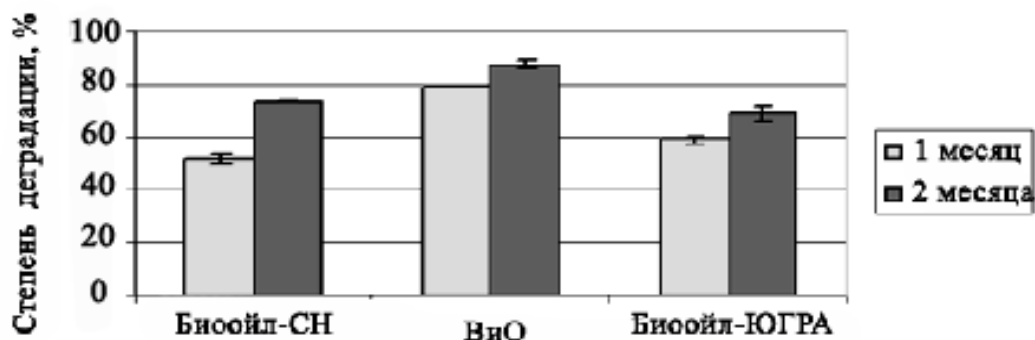


Рис.15. Эффективность деградации нефти на загрязненных участках, обработанных различными растительно-микробными ассоциациями

Численность микроорганизмов ассоциации «ВиО» на корнях растений была одинакова у всех штаммов ( $10^7$  КОЕ/г корня), а непосредственно в почве штаммы S26 и 1В оказались менее конкурентоспособными по сравнению с F701 и 7. Как было показано, штамм 1В имеет более низкую скорость хемотаксической реакции в отношении нефтепродуктов по сравнению с тремя

другими штаммами консорциума (Рис.14), причем при понижении температуры этот показатель также снижается, возможно, что, по-видимому, повлияло на численность бактерий в почве. Таким образом, результаты полевых испытаний показали эффективность и возможность осуществления биоремедиации *in situ* с помощью отселектированной микробно-растительной ассоциации в условиях резкого изменения температуры окружающей среды. Получены заключения о высокой эффективности биodeградации нефти ассоциацией «ВиО» от ОАО «Газпромнефть – Ноябрьскнефтегаз», ООО «Газпромнефть-Восток», «Сибнефть-Восток», ЗАО «Биоойл».

Полученные результаты по изучению взаимодействия микроорганизмов-деструкторов в ризосфере и ризоплане растений в присутствии углеводов 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 биodeградации различных поллютантов.

#### **Депонирование штаммов.**

Штаммы микроорганизмов были депонированы в коллекции культур микроорганизмов Научно исследовательского института Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» под следующими номерами:

*Acinetobacter baumannii* 1В – В1075;

*Acinetobacter baumannii* 7 – В1073;

*Rhodococcus erythropolis* S26 - В1072;

*Pseudomonas putida* F701(pF701a, pF701b) - В1074.

Свидетельства о депонировании штаммов прилагаются.

#### **Изучение патогенности микроорганизмов.**

Штаммы, входящие в состав данной ассоциации, прошли санитарно-гигиеническую оценку в Отделе изучения и мониторинга зоонозных инфекций Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Ассоциация была испытана в соответствии с МУ Минздрава СССР № 4263-67, № 2620-82 и с учетом рекомендаций ВОЗ (БЮЛ. ВОЗ 1981, №6 стр.20-27) и не оказала отрицательного влияния на лабораторных животных.

#### **Патентование ассоциации и биопрепарата для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами.**

Подана заявка на патент РФ № 2010121688 «Способ получения сухой формы биопрепарата для очистки территорий от загрязнений нефтью и нефтепродуктами». Приоритет 27.05.2010. Подготовлена патентная заявка на «Способ очистки почв от нефти и нефтепродуктов консорциумом плазмидосодержащих штаммов и ассоциированных с ними растений».

#### **Выводы**

1. При совместном культивировании *P. putida* КТ2442(pNF142::TnMod-OTc) и *P. aureofaciens* BS1393(pNF142::TnMod-OTc) в модельных системах, загрязненных нафталином, наблюдалась конкуренция

между этими штаммами за интермедиат пути деградации – катехол, а взаимодействие штаммов-деструкторов *P. putida* BS3701 и *Burkholderia* sp.BS3702 в процессе деградации фенантрена выразалось в их кооперации.

2. Кооперация штаммов-деструкторов углеводов нефти *P. putida* BS3701 и *Burkholderia* sp.BS3702 в процессе деградации фенантрена приводила к повышению защитного эффекта в отношении растений, что выразалось в увеличении длины их побега, а при конкуренции микроорганизмов *P. putida* KT2442(pNF142::TnMod-OTc) и *P. aureofaciens* BS1393(pNF142::TnMod-OTc) за катехол наблюдалось снижение защитного эффекта в отношении растений.

3. Установлено, что хемотаксис микроорганизмов в отношении углеводов нефти может быть одним из факторов, влияющих на численность штаммов-деструкторов в ризосфере растений. В геноме исследованных штаммов *P.putida* BS3701, F701, KT2442(pNF142::TnMod-OTc) и *P.aureofaciens* BS1393(pNF142::TnMod-OTc) были выявлены гены хемотаксиса, гомологичные ранее описанному гену *nahY*.

4. Среди 20 исследованных видов растений были выявлены наиболее устойчивые к нефтезагрязнению (газонная трава (Овсяница красная) и ячмень), которые были использованы для создания растительно-микробных ассоциаций.

5. Создана ассоциация микроорганизмов-деструкторов «ВиО», состоящая из *Rhodococcus erythropolis* S26, *Acinetobacter baumannii* 1В, *Acinetobacter baumannii* 7 и *Pseudomonas putida* F701, которая эффективно деградирует углеводороды нефти. При использовании растительно-микробных ассоциаций («ВиО»-ячмень или «ВиО»-газонная трава) эффективность деградации нефти возрастала по сравнению с применением только с микробной ассоциации.

6. В полевых испытаниях на территории Холмогорского нефтяного месторождения Ямало-Ненецкого автономного округа в период июнь-август 2008г наибольшая эффективность деградации нефти наблюдалась на участке, обработанном ассоциацией «ВиО» (89%) по сравнению с биопрепаратами фирмы ЗАО «Биоойл» (70-75%).

*Работа была выполнена при поддержке грантов РФФИ 08-04-99019-р\_офи, РФФИ 08-04-90028-Бел\_а, РФФИ-06-04-96318, а также гос. контрактов РНП 2.1.1.612, РНП 02.740.11.0296, РНП 02.740.11.0040, РНП 2.1.1.7789, РНП 2.1.1.9290, проект МНТЦ 3624.*

## Статьи

1. 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.

2. 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**, №4, том 78, 2009 , с.484-490

3. А.А. Ветрова, А.А. Овчинникова, А. Е. Филонов, И.Ф. Пунтус, А. М. Боронин Деструкция нефти бактериями рода *Pseudomonas*, содержащими различные плазмиды биодеградации. **Известия ТулГУ. Серия Химия**. 2008, Выпуск № 2, с. 186-193

4. А.А. Овчинникова, А.А. Ветрова, А. Е. Филонов, А. М. Боронин. Взаимодействие штаммов-деструкторов полициклических ароматических углеводов:



колонизация корней и защита растений от токсического действия фенантрена. **Известия ТулГУ. Серия Химия.** 2008, Выпуск № 1, с. 211-220

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

6. А.А.Игнатова (А.А. Овчинникова), А.А.Ветрова, А.В.Лисов, А.Е.Филонов, И.Ф.Пунтус, А.М.Боронин. Динамика численности и взаимодействие псевдомонад, стимулирующих рост растений, и штаммов-деструкторов нафталина в ризосфере горчицы белой. **Биотехнология**, 2006, № 6, с. 35-43.

7. Петриков К.В., Власова Е.П., Ветрова А.А., Овчинникова А.А., Пономорёва О.Н., Алфёров В.А, Пунтус И.Ф., Филонов А.Е. Получение сухой формы биопрепарата для очистки от нефтяных загрязнений и изучение его свойств при долговременном хранении. **Известия ТулГУ. Естественные науки.** 2010. Вып. 1. С. 186-195.

8. Петриков К.В., Овчинникова А.А., Ветрова А.А., Филонов А.Е., Пономорёва О.Н., Самойленко В.А, Якшина Т.В., Боронин А.М. СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СУХОЙ ФОРМЫ БИОПРЕПАРАТА ДЛЯ ОЧИСТКИ ТЕРРИТОРИЙ ОТ ЗАГРЯЗНЕНИЙ НЕФТЬЮ И НЕФТЕПРОДУКТАМИ. Заявка на патент Российской Федерации №2010121688. Приоритет 27.05.2010.

### **Тезисы**

1. A. Filonov, A. Ovchinnikova, A. Vetrova, I. Nechaeva, I. Puntus., L. Akhmetov, V. Zabelin, A. Boronin. Remediation of oil-spilled territories, using a biopreparation “MicroVac”, a consortium of plasmid-bearing strains “V&O” and associated plants. ISTC Workshop at the International Conference on Contamination Soil, ConSoil 2010. 21 – 25 September 2010, Salzburg, Austria, 2010, p. 222-223.

2. А.А. Овчинникова, А.А. Ветрова, А. Е. Филонов, А. М. Боронин. Деградация нефти микробно-растительными ассоциациями в лабораторных и полевых условиях. Экотоксикология 2009. Современные биоаналитические системы, методы и технологии. 26-30 октября 2009г. Пушино-Тула с.113-114

3. Ovchinnikova A.A., Vetrova A.A., Filonov A.E., Boronin A.M. Oil degradation by plant-microbial association in laboratory and field model systems. 3<sup>rd</sup> Congress of european microbiologists «Microbes and Man – Interdependence and Future Challenges» (Gothenburg, Sweden, June 28 – July 2, 2009).

4. Овчинникова А.А. Деградация нефти микробно-растительными ассоциациями в лабораторных и полевых условиях. Системная биология ПНЦ РАН апрель 2009г. Стр. 26-27.

5. Нечаева И.А., Ветрова А.А., Овчинникова А.А., Филонов А.Е. Разработка биопрепаратов для очистки почв от нефтяных загрязнений. Российский молодежный инновационный конвент. 9-10 декабря 2008, с.158-159

6. Овчинникова А.А., Ветрова А. А., Филонов А.Е Влияние микроорганизмов-деструкторов углеводов нефти и их ассоциации на биометрические характеристики растений в модельных системах, загрязненных нефтью. Биология-наука 21 века. 12-я Пушкинская школа-конференция молодых учёных, Пушино, 10-14 ноября 2008г., стр.216-217.

7. Овчинникова А.А., Ветрова А.А., Филонов А.Е. Исследование влияния ассоциации микроорганизмов-деструкторов углеводов нефти и растений на эффективность очистки модельных систем, загрязненных нефтью. Генетика микроорганизмов и биотехнология. Международная школа –конференция, посвященная 40-летию создания ГосНИИГенетика. Москва – Пушино, 21-24 октября 2008г., стр.71.

8. Ovchinnikova A.A., Vetrova A.A, Filonov A.E, Boronin A.M. Role of the plant-microbial association in oil degradation. Fifth international conference «Science and Training for Biosafety», 6 – 9 October, 2008, Pushchino, P. 178 – 179.

9. Filonov A.E., Nechaeva I.A., Vetrova A.A., Ovchinnikova A.A., Vlasova E.P., Petrikov K.V., Gafarov A.B., Puntus I.F., Akhmetov L.I. Oil spill bioremediation in cold climates:

development of biopreparations and their application. Icomid-2008. III International Conference on Microbial diversity. 28 September – 05 October 2008. P. 149 – 150

10. A. Filonov, I. Nechaeva, Vetrova A., A. Ovchinnikova., A. Gafarov., I. Puntus., L. Akhmetov. Psychotropic Microorganisms and Catabolic Plasmids for Oil Spills Bioremediation. ISTC Workshop at the International Conference on Contamination Soil, ConSoil 2008. 3 – 6 June 2008, Milan, Italy, 2008, p. 61-69.

11. Anastasia Ovchinnikova, Anna Vetrova, Andrey Filonov. Effect of microbial interactions on pah degradation efficiency and sinapis alba L. biometric characteristics in model systems. XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology 5-9 August 2008, Istanbul. P 100-101.

12. A. Filonov, I. Nechaeva, Vetrova A., A. Ovchinnikova., A. Gafarov., I. Puntus., L. Akhmetov. Psychotropic Microorganisms and Catabolic Plasmids for Oil Spills Bioremediation. ISTC Workshop at the International Conference on Contamination Soil, ConSoil 2008. 3 – 6 June 2008, Milan, Italy, 2008, p. 61-69.

13. Овчинникова А.А., Ветрова А.А. Влияние взаимодействия штаммов деструкторов на эффективность биodeградации ПАУ в ризосфере растений. Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» 7 - 11 апреля, 2008.

14. Овчинникова А.А. Взаимодействие бактерий, стимулирующих рост растений и микроорганизмов-деструкторов в ризосфере и ризоплане в присутствии полициклических ароматических углеводородов и его роль в повышении эффективности фиторемедиации Устный доклад на школе-семинаре «Современные наукоемкие технологии: от идеи к внедрению» 29 октября по 4 ноября 2007 года.

15. Ovchinnikova A.A., Vetrova A.A., Filonov A.E., Boronin A.M. Interaction of degrader strains in the rhizosphere and their influence on phenanthrene degradation degree and growth characteristic of *Sinapis alba* L. Materials of the Fourth International Conference on Science and Business, Pushchino, 15-18 October, 2007. P. 224-226.

16. Игнатова А.А. (Овчинникова А.А.) Взаимодействие бактерий, стимулирующих рост растений, и штаммов-деструкторов в ризосфере горчицы в условиях загрязнения нафталином. Всероссийская молодежная школа-конференция «Современная биотехнология – защите окружающей среды». 12 сентября, 2006, Пушкино.

17. Игнатова А.А. (Овчинникова А.А.), Ветрова А.А., Пунтус И.Ф., Филонов А.Е. Динамика численности и влияние на растения PGPR и микроорганизмов - деструкторов в модельной почве при загрязнении нафталином. Биология-наука 21 века. 10-я Пушкинская школа-конференция молодых учёных. 17-21 апреля 2006 г., Пушкино, с.372-373.

18. Ветрова А.А., Игнатова А.А. (Овчинникова А.А.), Ахметов Л.И., Пунтус И.Ф., Филонов А.Е. Исследование влияния кatabолических плазмид на деградацию полициклических ароматических углеводородов // Сборник статей. Российская школа-конференция молодых ученых «Экотоксикология-современные биоаналитические системы, методы и технологии» 28 октября-3 ноября 2006, Пушкино, с. 54.

19. Игнатова А.А. (Овчинникова А.А.), Ветрова А.А., Пунтус И.Ф., Ахметов Л.И., Филонов А.Е. Взаимодействие бактерий родов *Pseudomonas* и *Burkholderia* в растительно-микробных ассоциациях, в условиях загрязнения модельной системы фенантеном // Сборник статей. Российская школа-конференция молодых ученых «Экотоксикология-современные биоаналитические системы, методы и технологии» 28 октября-3 ноября 2006, Пушкино, с. 55