

На правах рукописи

КОРШУНОВА

Татьяна Юрьевна

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ ЛИКВИДАЦИИ
НЕФТЕЗАГРЯЗНЕНИЙ В РАЗЛИЧНЫХ КЛИМАТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

03.02.03 – микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Уфа – 2019

Работа выполнена в Уфимском Институте биологии – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского Федерального исследовательского центра Российской академии наук (УИБ УФИЦ РАН)

Научные консультанты:

Логинов Олег Николаевич, доктор биологических наук, профессор, УИБ УФИЦ РАН
Мелентьев Александр Иванович, доктор биологических наук, профессор, УИБ УФИЦ РАН

Официальные оппоненты:

Ившина Ирина Борисовна, академик РАН, доктор биологических наук, профессор, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» - филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского Федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, лаборатория алканотрофных микроорганизмов, заведующая

Назина Тамара Николаевна, доктор биологических наук, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, г. Москва, лаборатория нефтяной микробиологии, заведующая

Филонов Андрей Евгеньевич, доктор биологических наук, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», г. Пушкино, лаборатория биологии плазмид, главный научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный университет», г. Уфа

Защита состоится «19» апреля 2019 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора) по адресу: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, кор. № 1

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Минобрнауки РФ. Диссертация и автореферат размещены на сайте www.obolensk.org/center/diss/competitor.htm. С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. При современном уровне развития нефтяной промышленности невозможно полностью исключить ее негативное воздействие на экосистемы. Нефть и нефтепродукты признаны основными загрязнителями окружающей среды (Eurosoil, 2008; Robertson, Hansen, 2015), которые по величине своего вредного влияния находятся на втором месте после радиоактивного загрязнения (Экологические проблемы..., 2007) и представляют серьезную опасность для здоровья человека (Смирнова, Кузнецова, 2014; Xue et al., 2015; Cociârță et al., 2017; Varjani et al., 2018). В нашей стране проблема контаминация углеводородсодержащими веществами особенно актуальна для Западной Сибири, где расположено много нефтедобывающих предприятий и природно-климатические условия которой могут обеспечить лишь невысокую скорость процессов самоочищения нефтезагрязненных объектов (Алексеев и др., 2011; Корнейкова и др., 2011).

Крупнотоннажные отходы процессов добычи и нефтепереработки также являются одними из высокотоксичных загрязнителей окружающей среды. Они занимают обширные территории, уродуют ландшафт, служат источником вторичной контаминации почв, воздуха, поверхностных и подземных вод (Каталитические..., 2013; Литвинова, 2016; Соколов, 2017).

Наиболее экологически и экономически целесообразным способом очистки нефтезагрязненных объектов является применение биологических технологий, основанных на использовании углеводородокисляющих микроорганизмов (Хоменко, Ногина, 2015; Ichor et al., 2014; Ivshina et al., 2015; Hazen et al., 2016; Orellana et al., 2017; Xu, Zhou, 2017). Известно множество микроорганизмов различных родов, обладающих способностью к нефтедеструкции (Филонов, 2016; Плешакова и др., 2017; Bhattacharya et al., 2015; Ivshina et al., 2016; Salam, 2016; Koshlaf, Ball, 2017).

Для восполнения дефицита азота, возникающего при попадании нефти в почву, обычно используют большие дозы минеральных азотных удобрений, что является экономически невыгодным и экологически небезопасным (Шаронова и др., 2009; Sutton et al., 2011). Между тем, в природных экосистемах накопление азота происходит за счет деятельности азотфиксирующих микроорганизмов, некоторые из которых способны не только к диазотрофии, но и к усвоению углеводов (Mazumdar et al., 2015; Pérez-Vargas et al., 2017). Поэтому работы по поиску и изучению свойств микроорганизмов-нефтедеструкторов и их способности к окислению различных углеводородных субстратов, а также созданию на их основе полифункциональных биопрепаратов не только для очистки, но и для восстановления окружающей среды, остаются актуальными. При этом возрастает значимость таксономических исследований, базирующихся на комплексном применении различной информации фенотипического, генотипического, филогенетического, хемотаксономического и экологического характера (Назина и др., 2015; Das et al., 2014; Zhu et al., 2015) и направленных на получение детальной характеристики микроорганизмов и четкую дифференциацию штаммов.

Степень разработанности темы. К настоящему времени уже разработано большое число биопрепаратов-нефтедеструкторов для очистки почвы и воды (Алексеев и др., 2008; Филонов и др., 2010; Рогозина и др., 2014; Волков и др., 2015). Однако природно-климатические условия очищаемых территорий, а также качественный и количественный состав нефти и нефтепродуктов неодинаковы, что объясняет необходимость продолжения исследований по созданию биопрепаратов для очистки окружающей среды от углеводородного загрязнения и разработке технологий их применения.

Несмотря на достигнутые успехи в развитии молекулярно-генетических и хемотаксономических подходов при идентификации микроорганизмов, базы данных по нуклеотидным последовательностям генов, жирным кислотам клеточной стенки и клеточным белкам в основном содержат данные по клинически значимым штаммам и все еще недостаточны для установления таксономической принадлежности большинства штаммов, перспективных в биотехнологическом плане.

Целью исследования являлось создание на основе новых микроорганизмов полифункциональных биопрепаратов для очистки объектов окружающей среды от нефтяного загрязнения, обезвреживания нефтесодержащих отходов и восстановления почв в различных климатических условиях, а также разработка технологий их применения и производства в промышленных масштабах.

Задачи исследования

1. Выделить из нефтезагрязненных почв микроорганизмы, способные к эффективному окислению углеводородов, в т.ч. при низкой положительной температуре.
2. Выделить из почв сельскохозяйственного назначения бактерии, продуцирующие вещества, стимулирующие рост и развитие растений.
3. Описать фенотипические, молекулярно-генетические и хемотаксономические особенности изолятов и определить их таксономическое положение согласно требованиям современной систематики прокариот.
4. Изучить свойства выделенных бактерий, позволяющие использовать их для очистки и восстановления экосистем от загрязнения нефтью и нефтепродуктами.
5. Установить возможность применения исследованных микроорганизмов для очистки почв и грунтов, загрязненных нефтью, а также обезвреживания нефтесодержащих отходов в лабораторных и полевых экспериментах в различных климатических условиях.
6. Проверить эффективность использования описанных микроорганизмов для очистки водных поверхностей и производственных сточных вод от нефти и нефтепродуктов.
7. Разработать на основе изученных микроорганизмов полифункциональные биопрепараты-нефтедеструкторы для очистки и восстановления загрязненных углеводородами объектов для различных климатических условий.

8. Разработать и утвердить в соответствии с действующим законодательством нормативно-техническую документацию на производство и технологию применения биопрепаратов-нефтедеструкторов.

Научная новизна. Выделен новый нефтеокисляющий консорциум и установлена видовая принадлежность входящих в его состав штаммов – *Acinetobacter calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *Ochrobactrum intermedium* ИБ ДТ-5.3/2.

Впервые из нефтезагрязненной почвы Туруханского района Красноярского края выделен штамм ИБ 1.1, разлагающий нефть, в т.ч. при низкой положительной температуре, который идентифицирован как представитель нового вида бактерий р. *Pseudomonas*. Описан и таксономически узаконен новый вид микроорганизмов *P. turukhanskensis*.

Выделен и идентифицирован новый штамм микроорганизмов *Pseudomonas koreensis* ИБ-4, синтезирующий фитогормоны цитокининового ряда и индолил-3-уксусную кислоту (ИУК), а также фиксирующий в значительных количествах атмосферный азот.

Выявлено, что консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, а также штамм *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T способны к окислению углеводородов до углекислого газа и воды, а также к diazotрофии, в т.ч. при низкой положительной температуре.

Установлено, что использование консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 эффективно для очистки почв, грунтов, водной поверхности и производственных сточных вод от нефтяного загрязнения, а также обезвреживания отходов нефтедобывающих и нефтеперерабатывающих предприятий.

Показана возможность рекультивации нефтесодержащих отходов, а также песка и почвы, загрязненных нефтью, штаммом *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T, в т.ч. при низкой положительной температуре.

Предложен новый подход к ликвидации последствий нефтяных загрязнений биотехнологическими методами, основанный на использовании полифункциональных биопрепаратов, которые снижают содержание углеводородов в рекультивируемых объектах и способствуют восстановлению почвы путем фиксации атмосферного азота и стимуляции роста и развития растений-фитомелиорантов.

Новизна исследований подтверждена 4 патентами РФ: на питательную среду для культивирования бактерий р. *Pseudomonas* (№ 2303061); на консорциум штаммов микроорганизмов *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 и *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2, используемый для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов (№ 2553540); на способ очистки почв от нефти в условиях низких положительных температур психротолерантными бактериями *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 (№ 2539148); на способ очистки водных поверхностей от нефтяного загрязнения (№ 2627598).

Теоретическая значимость. Результаты, полученные в процессе идентификации бактерий, выделенных в настоящем исследовании, и описания нового вида микроорганизмов, способствуют установлению видовой принадлежности других микроорганизмов за счет расширения баз данных по нуклеотидным последовательностям генов, кодирующих 16S рРНК, β -субъединицу ДНК-гиразы (*gyrB*), β -субъединицу РНК-полимеразы (*rpoB*), σ -субъединицу РНК-полимеразы (*rpoD*), жирным кислотам клеточной стенки и клеточным белкам, а также имеют важное значение для фундаментальных исследований в различных областях науки (экология, генетика и эволюция микроорганизмов и пр.). Представленные в работе данные являются теоретической основой для дальнейших исследований в направлении расширения полифункциональности биопрепаратов для экобиотехнологии. Материалы диссертации используются при чтении лекций по программе профессиональной переподготовки профессорско-преподавательского состава биологического факультета ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет» по направлению «Биотехнология».

Практическая значимость. Настоящее исследование имеет выраженное прикладное значение и направлено на решение такой важной экологической и хозяйственной проблемы, как ликвидация последствий загрязнения окружающей среды нефтью и нефтепродуктами. На основе выделенных в ходе работы углеводородокисляющих микроорганизмов создана серия полифункциональных биопрепаратов под торговой маркой «Ленойл»®, предназначенных для очистки нефтезагрязненных объектов окружающей среды, обезвреживания твердых нефтесодержащих отходов, а также для восстановления почв в различных климатических условиях. Разработана и внедрена технология их производства, которое осуществляет ЗАО НПП «Биомедхим» (г. Уфа). За период с июня 2012 г. получено более 384200 л жидких и 75210 кг сухих препаратов. Разработана технология применения биопрепаратов, которая успешно апробирована (в т.ч. в промышленных масштабах) в различных климатических условиях при обезвреживании твердых нефтесодержащих отходов в Оренбургской области и Республике Казахстан, а также для ликвидации последствий нефтяных разливов в Ханты-мансийском автономном округе-Югра (ХМАО-Югра) и Ямало-Ненецком автономном округе (ЯНАО) и очистки водной поверхности болота от нефти в ЯНАО.

Все бактериальные штаммы, выделенные и изученные в работе, депонированы во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов (ВКМ), а штамм *P. turukhanskensis* ИБ 1.1, кроме того, размещен на хранение в Испанской коллекции типовых культур (СЕСТ).

Методология и методы исследования. Методология исследований выстроена исходя из цели и задач диссертационной работы. Предметом изучения являлись свойства новых природных штаммов бактерий, необходимые для их идентификации и применения в экологической биотехнологии; возможность использования исследованных микроорганизмов для очистки и восстановления окружающей среды от нефтяного

загрязнения; технологии получения и применения биопрепаратов на основе этих микроорганизмов. Научная литература, посвященная исследованиям в области идентификации бактерий и изучения их свойств, была проанализирована формально-логическими методами. В работе использованы микробиологические, молекулярно-генетические, хемотаксономические, биохимические, физические и статистические методы исследования, а также методы биотестирования.

Объектами исследования служили микроорганизмы рр. *Acinetobacter* и *Ochrobactrum*, образующие природный консорциум, выделенный из почвы, загрязненной дизельным топливом и способные к окислению нефти и нефтепродуктов; штамм бактерий *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1, изолированный из нефтезагрязненной почвы Красноярского края и обладающий деструктивной активностью по отношению к нефти, в т.ч. при низкой положительной температуре; штамм *Pseudomonas* sp. ИБ-4, выделенный из пахотных почв, способный к азотфиксации и синтезу фитогормонов; штамм *Paenibacillus ehimensis* ИВ 739 из коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН (ВКМ В-2680D), продуцирующий различные биологически активные вещества, в т.ч. стимулирующие рост и развитие растений.

Микробиологические методы. Микроорганизмы выделяли методом накопительных культур: углеводородокисляющие микроорганизмы (УОМ) – на среде Раймонда (Raymond, 1961) и на среде Цукамуры (Сэги, 1983), бактерии р. *Pseudomonas* из пахотных почв – на среде Козера (Сэги, 1983). Для определения окислительной активности бактерии выращивали на среде Диановой и Ворошиловой (Держинская, 2008), для подсчета количества азотфиксирующих микроорганизмов и обнаружения нитрогеназной активности – на среде Эшби (Держинская, 2008), для анализа состава жирных кислот клеточной стенки и определения хинонов – на коммерческой среде TSA (Merck, США). Гетеротрофные микроорганизмы и бактериальные клетки для проведения матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) культивировали на питательном агаре (Держинская, 2008). Предварительную идентификацию микроорганизмов проводили по культурально-морфологическим и физиолого-биохимическим признакам по стандартным методикам. Морфологию клеток изучали с помощью атомно-силовой микроскопии.

Молекулярно-генетические методы. ДНК из клеток бактерий выделяли с помощью комплекта реагентов «РИБО-сорб» (АмплиСенс, Россия). Реакции амплификации и секвенирования проводили с использованием следующих праймеров: гена 16S рРНК – 27F и 1492R (Lane, 1991), гена *gyrB* – UP-1 и UP-2r (Yamamoto, Narayama, 1995, 1998), гена *rpoD* – PsEG30F и PsEG790R (Mulet et al., 2009), гена *rpoB* – LAPS5F и LAPS27R (Tayeb et al., 2005). Для предварительного анализа нуклеотидных последовательностей генов использовали пакет программ BLASTN (Altschul et al., 1990) и EzTaxon (Kim et al., 2012). Выравнивание последовательностей выполняли с помощью программы CLUSTAL (Thompson et al., 1997). Дендрограммы филогенетического сходства строили в программе MEGA5 (Tamura et al.,

2011). Содержания гуанин-цитозиновых пар (ГЦ-пар) в составе ДНК определяли методом термальной денатурации (Owen et al., 1969). ДНК-ДНК-гибридизацию проводили по методу Езаки (Ezaki et al., 1989) и методом оптической реассоциации (De Ley et al., 1970).

Хемотаксономические методы. Анализ состава жирных кислот выполняли хромато-масс-спектрометрическим методом и вещества идентифицировали с помощью базы данных масс-спектров NIST (<http://webbook.nist.gov/chemistry>), а также с помощью газовой хроматографии, используя систему MIDI Sherlock 6.1. Изопреноидные хиноны определяли по методу Коллинза (Collins, 1981, 1985), а клеточные белки – с помощью МАЛДИ-времяпролетной масс-спектрометрии.

Биохимические методы. Окислительную активность микроорганизмов рассчитывали по количеству образованного в результате окисления углеводов углекислого газа, оттитрованного кислотой. Нитрогеназную активность бактерий определяли методом, основанным на восстановлении ацетилен (Умаров, 1986). Потенциальную активность азотфиксации в почве определяли по Умарову (Теппер и др., 2004) с нашими модификациями. Способность к синтезу поверхностно-активных веществ (ПАВ) бактериями оценивали по снижению поверхностного натяжения и проявлению эмульгирующей активности (Cooper, Goldenberg, 1987). Способность к синтезу ИУК и цитокининоподобных веществ у микроорганизмов выявляли с помощью иммуно-ферментного анализа (Кудоярова и др., 1986, 1990).

Физические методы. Содержание углеводов в сточной воде определяли весовым методом после экстракции хлористым метиленом (Кобызева, 2009). Содержание нефтепродуктов (%) в почве, грунте и воде определяли гравиметрическим методом в соответствии с ПНД Ф 16.1.41-04 и ПНД Ф 14.1:2.116-97.

Методы биотестирования. Степень фитотоксичности (%) культуральной жидкости и нефтезагрязненного грунта оценивали по числу взошедших семян растений (Зенова и др., 2002).

Статистические методы. Обработку результатов исследований проводили в компьютерной программе Microsoft Excel 2003.

Положения, выносимые на защиту

1. Нефтеокисляющий консорциум, выделенный из почвы, загрязненной дизельным топливом, образован штаммами *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2. Выделенный из нефтезагрязненной почвы Красноярского края штамм ИБ 1.1, разлагающий нефть, является представителем нового вида микроорганизмов *P. turukhanskensis*. Штамм-антагонист фитопатогенных микромицетов ИБ-4, изолированный из пахотной почвы, относится к виду *P. koreensis*.

2. Консорциум и входящие в его состав штаммы *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 способны к окислению углеводов различных классов, нефти и

нефтепродуктов до углекислого газа и воды. Штамм *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 обладает поверхностно-активными свойствами, а штамм *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 – нитрогеназной активностью. Бактерия *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T обладает окислительной и нитрогеназной активностью, в т.ч. и при низкой положительной температуре. Штамм *P. koreensis* ИБ-4 способен к продукции фитогормонов и фиксации атмосферного азота.

3. Внесение консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 или штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T снижает содержание нефтепродуктов в загрязненных грунтах, почвах и твердых нефтесодержащих отходах и повышает в них численность микроорганизмов основных эколого-трофических групп.

4. Использование консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 эффективно для очистки водной поверхности и производственных сточных вод от углеводородного загрязнения.

5. Интродукция различных комбинаций консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 с бактериями *P. koreensis* ИБ-4 и *Paenibacillus ehimensis* ИВ 739 способствует очистке почвы от нефти и стимуляции роста и развития растений-фитомелиорантов.

6. Разработанная технология производства дает возможность получать как жидкую, так и сухую форму биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»®, а технология их применения позволяет очищать и восстанавливать сильнозагрязненные объекты окружающей среды и обезвреживать нефтесодержащие отходы.

Степень достоверности. О достоверности результатов работы свидетельствует как достаточный объем проведенных исследований по идентификации и изучению свойств выделенных микроорганизмов, так и то, что для этого были использованы современные биохимические, молекулярно-генетические и хемотаксономические методы, а также применена статистическая обработка данных. Разработанные биопрепараты успешно прошли лабораторные и полевые испытания, в т.ч. в промышленных масштабах. Осуществляется выпуск и продажа разработанной продукции.

Апробация работы. Основные результаты исследований были представлены на Международной научно-технической конференции «Нефтегазопереработка и нефтехимия – 2007» (г. Уфа, 2007), Всероссийской молодежной конференции «Актуальные проблемы химии и биологии» (г. Пущино, 2012), VI Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (г. Саратов, 2012), научно-практической конференции «Государственная политика в области охраны окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» (г. Уфа, 2012), VIII и IX Молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (г. Москва, 2012, 2013), Всероссийской научно-технической конференции «Инновационные технологии в области химии и биотехнологии» (г. Уфа,

2012), V и VIII Международной заочной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы науки и техники» (г. Уфа, 2012, 2015), II Всероссийской научно-технической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Высокие технологии в современной науке и технике» (ВТСНТ-2013) (г. Томск, 2013), Международной научной конференции «Экобиотех» (г. Уфа, 2013, 2015, 2017), III Международной научно-практической конференции «Экологические проблемы нефтедобычи» (г. Уфа, 2013), Школе-конференции молодых ученых на базе Института фундаментальных проблем биологии РАН «Биосистема: от теории к практике» (г. Пущино, 2013), VII, VIII, IX Всероссийской научной интернет-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии» (г. Уфа, 2013, 2014, 2015), VI Международной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы науки и техники – 2013» (г. Уфа, 2013), Международной заочной научно-практической конференции «Современные тенденции в образовании и науке» (г. Тамбов, 2014), IX Международной конференции «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» (г. Донецк, 2015), Международной научной конференции PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (г. Уфа, 2018).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 50 научных работ, в том числе 18 статей в журналах, входящих в перечень, рекомендованный ВАК Минобрнауки РФ и получено 4 патента РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, экспериментальной части, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Работа изложена на 427 страницах, содержит 29 таблиц, 20 рисунков. Список литературы включает 918 наименований, из них 430 на английском языке.

Личный вклад автора заключается в формулировании цели и задач исследования, решении поставленных задач, планировании экспериментов и их выполнении, обобщении результатов и использовании их на практике, разработке основных положений диссертации, выносимых на защиту и нормативно-технической документации на производство и применение биопрепаратов. Результаты работы являются совокупностью многолетних научных исследований, проведенных в УИБ УФИЦ РАН лично автором и при его непосредственном участии в качестве ответственного исполнителя. Часть исследований выполнена в соавторстве с сотрудниками УИБ УФИЦ РАН д.б.н., проф. О.Н. Логиновым, д.б.н., проф. А.И. Мелентьевым, д.б.н. С.П. Четвериковым, к.б.н. М.Д. Бакаевой, к.б.н. Г.Ф. Рафиковой, аспирантами УИБ УФИЦ РАН С.Р. Мухаматдьяровой, Э.Г. Валиуллиным, Д.А. Шариповым, Л.Ф. Миннебаевым. Работы по описанию нового вида микроорганизмов проводились совместно с учеными из Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, IRNASA-

CSIC и Unidad Asociada Grupo de Interacción Planta-Microorganismo Universidad de Salamanca-IRNASA (CSIC) (Испания) PhD. М.-Н. Ramírez-Bahena, PhD. J.M. Igual, PhD. A. Peix.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научным консультантам – заведующему лабораторией УИБ УФИЦ РАН, д.б.н., профессору О.Н. Логинову за идейное вдохновение, постоянное внимание и неоценимую поддержку и научному руководителю учреждения УИБ УФИЦ РАН, д.б.н., проф. А.И. Мелентьеву за ценные советы и рекомендации; ведущему научному сотруднику лаборатории биотехнологий УИБ УФИЦ РАН, д.б.н. С.П. Четверикову за научно-методическую помощь при постановке экспериментов и обсуждении результатов; аспирантам С.Р. Мухаматдыровой, Э.Г. Валиуллину и Д.А. Шарипову за их участие в проведении полевых испытаний и первичной обработке полученных данных, а также всем сотрудникам лаборатории биотехнологий УИБ УФИЦ РАН за постоянное содействие и дружескую поддержку. Автор благодарит заведующего лабораторией ИБГ УФИЦ РАН, к.б.н. Р.Р. Гарафутдинова за помощь при изучении морфологии клеток на сканирующем зондовом микроскопе, а также заведующую лабораторией ЗАО НПП «Биомедхим», к.б.н. Е.А. Столярову за ее вклад при подготовке нормативно-технической документации на производство биопрепаратов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ (Главы 1-6)

В обзоре литературы представлен анализ публикаций отечественных и зарубежных авторов, посвященных вопросам воздействия нефти и нефтепродуктов на почву и водную среду, биологической очистки природных объектов и производственных сточных вод от углеводородов, методам снижения отрицательного воздействия на экологическую обстановку нефтесодержащих отходов. Подробно рассмотрены роль микроорганизмов различных родов в процессах очистки окружающей среды от углеводородного загрязнения и применение микроорганизмов с заданными свойствами для деградации нефти и нефтепродуктов в экосистемах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ (Глава 7)

В разделе подробно описываются методы выделения, идентификации и изучения свойств микроорганизмов, методика проведения лабораторных и полевых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 8 посвящена результатам выделения и идентификация микроорганизмов, перспективных с точки зрения биотехнологии.

Описание микроорганизмов, составляющих нефтеокисляющий консорциум

Выделение, культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства микроорганизмов консорциума

Из загрязненной дизельным топливом серой лесной почвы Республики Башкортостан выделено 48 изолятов микроорганизмов, способных к росту и разложению нефти в жидкой

среде. Среди них наибольшей активностью обладал образец ИБ ДТ-5, представляющий собой природный консорциум из двух штаммов, которые на основании фенотипических и физиолого-биохимических свойств были отнесены к рр. *Acinetobacter* и *Ochrobactrum*. Количественное содержание каждого из штаммов микроорганизмов, входящих в состав консорциума, составляло в культуральной жидкости порядка $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл (1:1) и не изменялось при длительном хранении.

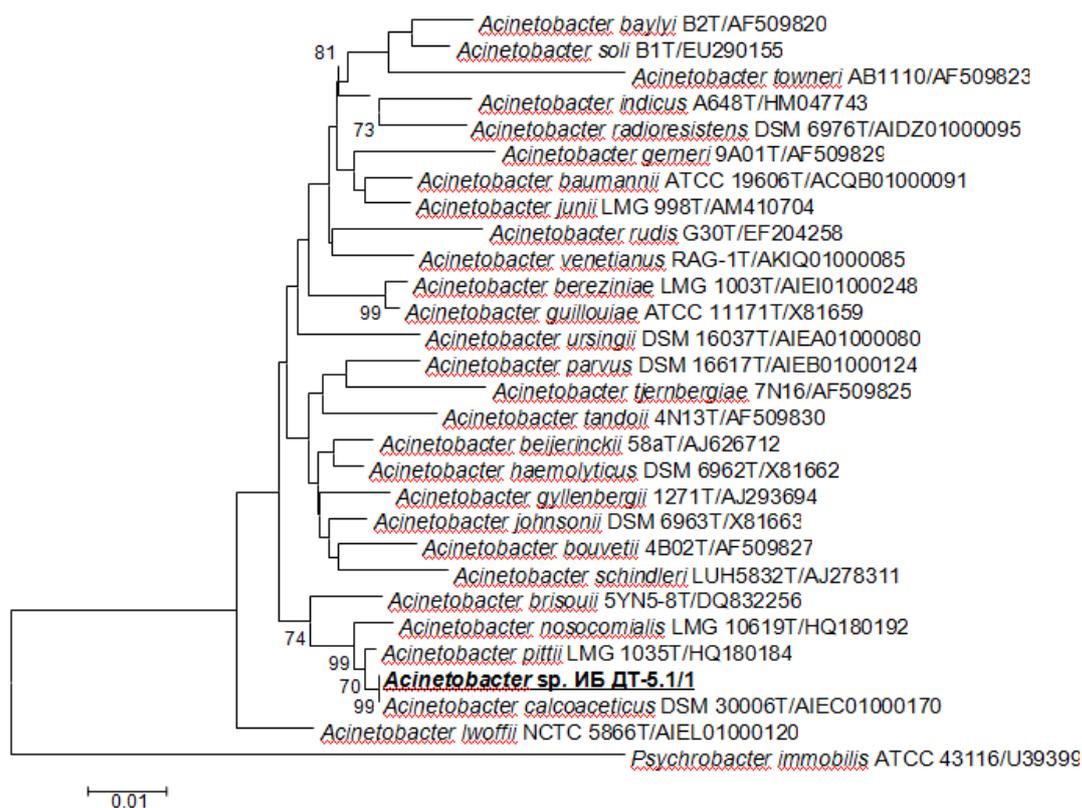
Клетки штамма *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 – толстые, короткие, неподвижные палочки, часто встречаются кокковидные одиночные или сдвоенные формы, иногда в скоплениях, размеры 0,7-1,5×0,7-1,0 мкм. Колонии на плотных питательных средах круглые, плоские, белые, блестящие, гладкие, с ровными краями. Каталазоположительные, оксидазоотрицательные.

Клетки штамма *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 – короткие палочки, по мере старения культуры укорачивающиеся до кокков, одиночные или в скоплениях, окруженные слизью, размеры 1,2-1,3×0,5 мкм. Подвижные, имеют 1-3 жгутика. Колонии на плотных питательных средах круглые, плоские, бесцветные, матовые, гладкие, с ровными краями, по краям менее плотные, чем в центре. Каталазоположительные, оксидазоположительные.

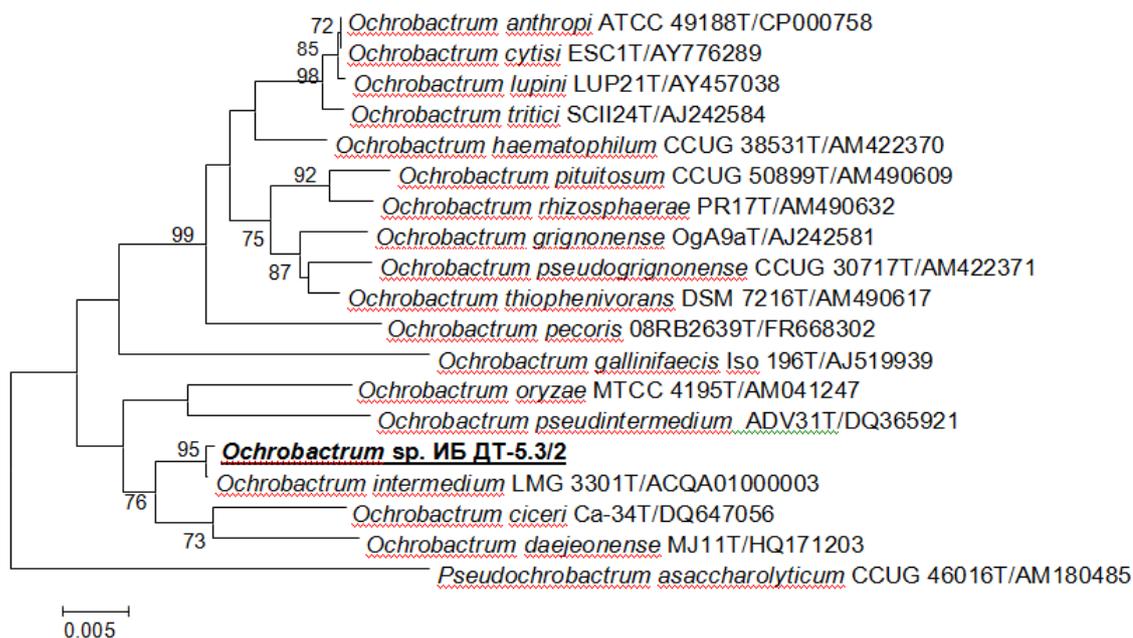
Оба штамма представляют собою грамотрицательные, аэробные, неспорообразующие бактерии, способные к росту при NaCl не более 2,5-3%, pH среды 4,6-8,6 и температуре 8-42°C. Оптимальными условиями для развития являются pH 6,8-7,2 и температура 26-28°C. При окислении лактозы не образуют индола, сероводорода и 3-кетолактозы. Потребляют цитрат и малонат. Не подвергают гидролизу казеин, крахмал, желатину. Разлагают мочевины и твин 20. Утилизируют нефть, дизельное топливо, углеводороды различных классов и их производные. Штаммы *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 и *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 помещены на хранение во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов (VKM В-753D и VKM В-2754D соответственно).

Генотипическая характеристика штаммов, образующих консорциум

Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Определение и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК штаммов *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 (1425 п.н., GenBank KJ461687) и *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 (1379 п.н., GenBank KJ683734) свидетельствует о том, что наиболее близкородственным штаммом для *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 является штамм *A. calcoaceticus* DSM 30006^T (99,93% сходства), а для *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 – штамм *O. intermedium* LMG 3301^T (99,93% сходства). На дендрограммах филогенетического сходства *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 образует один кластер со штаммом *A. calcoaceticus* DSM 30006^T (рис. 1(А)), а *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 – со штаммом *O. intermedium* LMG 3301^T (рис. 1(Б)).



(A)



(B)

Рисунок 1 – Филогенетическое положение штаммов *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 (A) и *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 (B) на основании анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Дендрограммы построены методом Neighbor-Joining (Saitou, Nei, 1987) с использованием 2-х параметрической модели Кимура (Kimura, 1980). Масштаб – 1 замена на каждые 100 нуклеотидов (A) или 5 замен на каждые 1000 нуклеотидов (B). Числами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа (приведены значения “bootstrap”-анализа выше 70%)

Анализ нуклеотидных последовательностей гена *gyrB*. Определение и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена *gyrB* штаммов *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 (745 п.н., GenBank KX034109) и *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 (719 п.н., GenBank KU928130) выявил невысокую степень их гомологии с последовательностями представителей р. *Acinetobacter* (94% сходства со штаммом *A. oleivorans* DR1, 92% со штаммом *A. calcoaceticus* PHEA-2) и р. *Ochrobactrum* (90% сходства со штаммом *O. anthropi* ATCC 49188^T и 90% со штаммом *O. anthropi* OAB). Эти данные указывают на то, что на настоящий момент указанный ген имеет низкую разрешающую способность в качестве дополнительного маркера для определения видовой структуры бактерий этих родов.

Хемотаксономические особенности микроорганизмов консорциума

Состав жирных кислот клеточной стенки. У штамма *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 преобладали гексадекановая C_{16:0} (25,0%), 9-цис-гексадеценная C_{16:1w7c} (18,9%) и 9-цис-октадеценная C_{18:1w9c} (27,3%) кислоты, характерные для представителей вида *A. calcoaceticus* (Yang et al., 2012).

У штамма *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 доминирующими являлись октадеценная C_{18:1} (31,5%) и циклопропан-нонадекановая C_{19:0 cyclo} (20,1%) жирные кислоты, типичные для р. *Ochrobactrum* (Kampfer et al., 2011; Woo et al., 2011).

Белковые профили клеток. В результате сравнительного анализа МАЛДИ-масс-спектров клеточных белков с высокой степенью родовой идентификации и вероятностью видовой идентификации установлено, что штамм *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 принадлежит к виду *A. calcoaceticus*, а штамм *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 – к виду *O. intermedium*.

Т.о., исходя из требований современной систематики прокариот, изучены фенотипические, физиолого-биохимические свойства, проведен сравнительный анализ нуклеотидной последовательности генов 16S рРНК и *gyrB*, исследованы качественный и количественный состав жирных кислот клеточной стенки и белковый профиль клеток микроорганизмов, образующих консорциум. В результате этого установлено, что консорциум состоит из бактерий *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2.

Описание штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1

Выделение, культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства

Из образцов нефтезагрязненной почвы Красноярского края было выделено 14 изолятов, разлагающих нефть в жидкой среде при низкой положительной температуре (4-6°C), среди которых наибольшую активность проявил образец ИБ 1.1. Его клетки – прямые палочки размером 2,5-3,3×1,0-1,1 мкм, подвижные, имеют один полярный жгутик. Не образуют спор. Колонии на питательном агаре округлые, выпуклые, бежевые, полупрозрачные, диаметром около 2 мм. Образуют флуоресцирующий пигмент при выращивании на среде Кинг Б (Держинская, 2008). Грамотрицательные, строго аэробные. Каталазо- и оксидазоположительные. Метаболизм – окислительный, способны к

денитрификации. Растут при температуре 0-34°C, с оптимумом при 28°C. Диапазон pH – 6-8. Индол не образуют, используют в качестве источника углерода углеводороды различных классов и их производные, а также нефть и нефтепродукты. На основании культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств штамм был отнесен к р. *Pseudomonas*.

Генотипическая характеристика штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1

Анализ гена 16S рРНК. В результате определения и сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК (1412 п.н., GenBank KP306892) наиболее близкими родственными видами штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 оказались *P. granadensis* F-278,770^T (Pascual et al., 2015) (98,7% сходства) и *P. punonensis* LMT03^T (Ramos et al., 2013) (98,6% сходства). Филогенетическое положение микроорганизма отражено на дендрограмме (рис. 2). Изучаемый микроорганизм не входит в один кластер с родственными штаммами *P. granadensis* F-278,770^T и *P. punonensis* LMT03^T и образует отдельную ветвь на древе. Поэтому было выдвинуто предположение о том, что штамм *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 может являться представителем нового вида р. *Pseudomonas*.

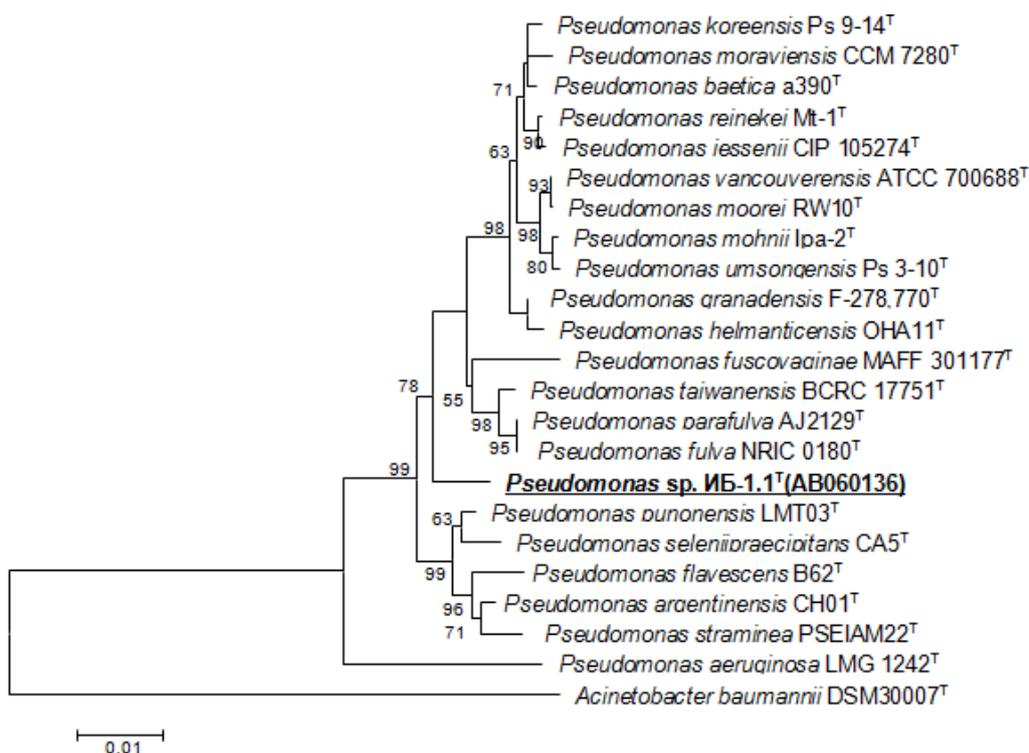


Рисунок 2 – Филогенетическое положение штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 на основании анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Дендрограмма построена методом Neighbor-Joining (Saitou, Nei, 1987) с использованием 2-х параметрической модели Кимура (Kimura, 1980). Масштаб – 1 замена на каждые 100 нуклеотидов. Числами показана достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа (приведены значения “bootstrap”-анализа выше 50%)

Анализ генов *rpoB*, *rpoD* и *gyrB*. Для проверки гипотезы, что штамм *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 представляет новый вид микроорганизмов, были определены и проанализированы нуклеотидные последовательности трех генов «домашнего хозяйства» – *rpoB* (1129 п.н., GenBank LT219439), *rpoD* (724 п.н., GenBank LT219438) и *gyrB* (1149 п.н., GenBank LT219440). Процент гомологии вычисляли после попарного сравнения. Филогенетическое древо, построенное на основании сравнения последовательностей генов *rpoB*, *rpoD* и *gyrB* согласовывалось с древом на основе анализа гена 16S рРНК, подтверждая принадлежность штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 к роду *Pseudomonas* (рис. 3). Сходство последовательностей генов «домашнего хозяйства» изучаемого штамма и *P. granadensis* F-278,770^T, *P. punonensis* LMT03^T, *P. argentinensis* CH01^T, *P. reinekei* Mt-1^T, *P. vancouverensis* DhA-51^T, *P. straminea* IAM 1598^T, *P. moorei* RW10^T и *P. helmanticensis* ОНА11^T было около 90% для *rpoB*, 77-78% – для *rpoD* и 84-87% – для *gyrB*. Эти данные свидетельствуют о значительном филогенетическом расстоянии между штаммом *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 и описанными видами р. *Pseudomonas*. Т.о., результаты анализа последовательностей генов *rpoB*, *rpoD* и *gyrB* также позволяют предположить, что штамм ИБ 1.1 является представителем нового, не описанного ранее вида р. *Pseudomonas*.

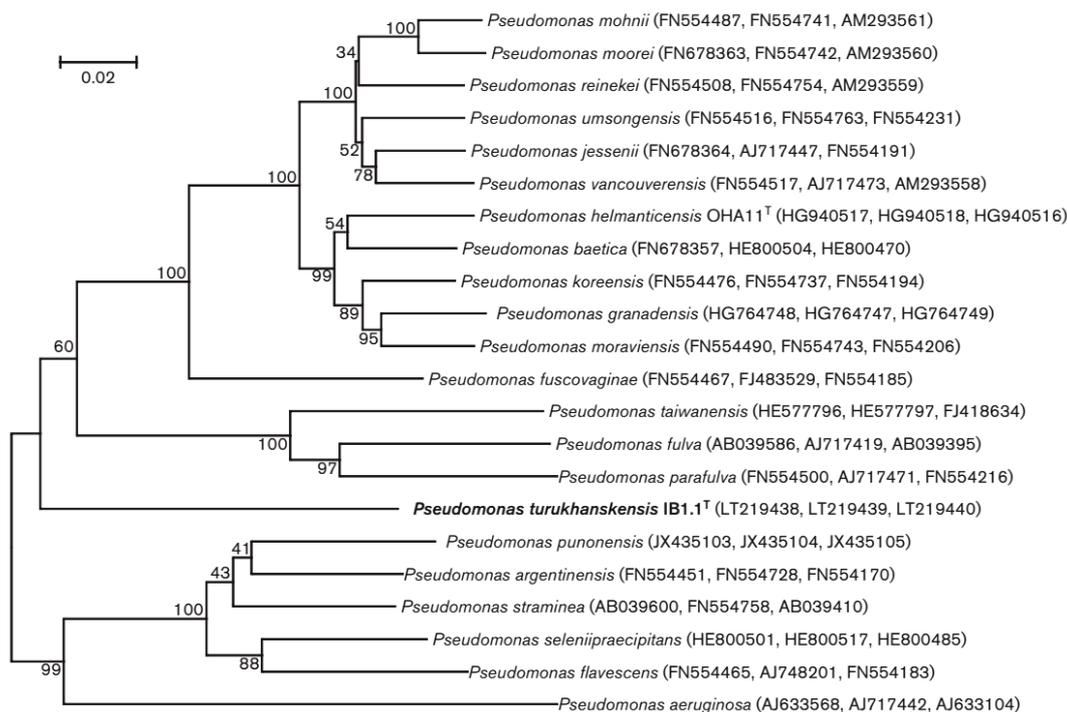


Рисунок 3 – Филогенетическое положение штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 на основании анализа нуклеотидных последовательностей генов *rpoB*, *rpoD* и *gyrB*. Дендрограмма построена методом Neighbor-Joining (Saitou, Nei, 1987) с использованием 2-х параметрической модели Кимура (Kimura, 1980). Масштаб – 2 замены на каждые 100 нуклеотидов. Числами показана статистическая достоверность порядка ветвления определенная с помощью “bootstrap”-анализа (приведены значения “bootstrap”-анализа выше 30%)

ДНК-ДНК-гибридизация. Штаммы бактерий относят к одному виду, если величина гибридации тотальных геномов составляет не менее 70% (Wayne et al., 1987; Stackebrandt et al., 2002). Средние значения ДНК-ДНК-гибридации штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 и 8 штаммов р. *Pseudomonas*, показавших более 98% гомологии по гену 16S рРНК (*P. granadensis* F-278,770^T, *P. punonensis* LMT03^T, *P. argentinensis* CH01^T, *P. reinekei* Mt-1^T, *P. vancouverensis* DhA-51^T, *P. straminea* IAM 1598^T, *P. moorei* RW10^T и *P. helmanticensis* ОНА11^T) во всех случаях были меньше, чем 30%.

Содержание ГЦ-пар в ДНК штамма ИБ 1.1 составляет 58,5 мол.%, т.е. находится в пределах диапазона, установленного для видов р. *Pseudomonas* (Palleroni, 2005).

Хемотаксономические особенности штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1

Анализ жирных кислот. У штамма *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 доминирующими являлись гексадекановая C_{16:0} (22,0%), изомеры гексадеценовой C_{16:1w7c}/C_{16:1w6c} (34,3%) и октадеценовой C_{18:1w7c}/C_{18:1w6c} (26,4%) жирных кислот, а минорными компонентами – 3-гидроксидекановая 3h-C_{10:0} (12,4%), додекановая C_{12:0} (7,6%) и 3-гидроксидодекановая 3h-C_{12:0} (3,5%) кислоты. Эти вещества характерны для видов р. *Pseudomonas* (Palleroni, 2005).

Анализ хинонов. Доминирующим хиноном в клетках *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 является убихинон Q9, что типично для бактерий р. *Pseudomonas* (Palleroni, 2005).

Т.о., фенотипические признаки, содержание ГЦ-пар в молекуле ДНК, хемотаксономические особенности штамма ИБ 1.1 свидетельствуют о его принадлежности к р. *Pseudomonas*. Однако он отличается от других видов рода по последовательности нуклеотидов гена, кодирующего 16S рРНК и трех генов «домашнего хозяйства» (*rpoD*, *rpoB* и *gyrB*), а также по уровню ДНК-ДНК-гибридации. Принимая во внимание вышесказанное, штамм *Pseudomonas* sp. ИБ 1.1 был классифицирован как представитель нового таксономически узаконенного вида р. *Pseudomonas*, для которого предложено название *Pseudomonas turukhanskensis* sp. nov.

Описание вида *Pseudomonas turukhanskensis* sp. nov.

Pseudomonas turukhanskensis sp. nov. (tu.ru.khansk.en'sis. N.L. fem. adj. – turukhanskensis) назван по территориальному источнику выделения штамма – Туруханскому району Красноярского края.

Клетки – прямые палочки размером 2,5-3,3×1,0-1,1 мкм, подвижные, имеют один полярный жгутик. Не образуют спор. Грамотрицательные, строго аэробные. Колонии на питательном агаре округлые, выпуклые, бежевые, полупрозрачные, диаметром 2 мм. Образуют флуоресцирующий пигмент при выращивании на среде Кинг Б. Растут в интервале температур от 0°C до 34°C, с оптимумом при 28°C. Диапазон pH – 6-8. Не растут при наличии в среде 5% NaCl. Каталазо- и оксидазоположительные. Метаболизм –

окислительный, обладают способностью к денитрификации. Не способны к ферментации сахаров в среде с пептоном. Не продуцируют аргининдегидролазу, уреазу и β -галактозидазу. Индол не образуют. Нитрат-редукция и гидролиз эскулина отсутствуют. Усваивают глюкозу, маннозу, маннит, капрат, адипат и малат. Не используют N-ацетилглюкозамин, мальтозу, глюконат, цитрат и фенилацетат. Ассимилируют твин 40, твин 80, L-арабинозу, D-фруктозу, α -D-глюкозу, D-маннит, D-маннозу, D-сорбит, сахарозу, D-трегалозу, метилпируват, моно-метилсукцинат, ацетат, *cis*-аконитат, цитрат, D-галактуронат, D-глюконат, D-глюкозамин, D-глюкуронат, β - и γ -гидроксибутират, α -кетоглутарат, D- и L-лактат, D-сахарат, сукцинат, бромсукцинат, L-аланинамид, D- и L-аланин, L-аланилглицин, L-аспарагин, L-аспартат, L-глутамат, L-гистидин, L-пролин, D- и L-карнитин, γ -аминобутират. Не разлагают α -циклодекстрин, декстрин, гликоген, N-ацетил-D-глюкозамин, N-ацетил-D-галактозамин, адонитол, *i*-эритритол, L-фукозу, D-галактозу, *m*-инозитол, α -D-лактозу, лактулозу, мальтозу, D-мелибиозу, β -метил-D-глюкозид, D-психозу, D-раффинозу, L-рамнозу, туранозу, ксилитол, формиат, α -гидроксибутират, итаконат, α -кетобутират, α -кетовалерат, малонат, себацинат, сукцинат, глюкуронамид, глицил-L-аспартат, L-орнитин, L-фенилаланин, D-серин, L-треонин, инозин, уридин, тимидин, фенилэтиламин, 2-аминоэтанол, 2, 3-бутандиол, глицерин и глюкозо-6-фосфат. Слабо утилизируют D-арабитол, D-целлобиозу, гентиобиозу, D-галактонат лактон, *p*-гидроксифенилацетат, пропионат, гидрокси-L-пролин, L-лейцин, L-пироглутамат, L-серин, D- и L- α -глицерофосфат и глюкозо-1-фосфат. Доминирующим хиноном является убихинон Q9, основными жирными кислотами – C_{16:0}, изомеры C_{18:1} и C_{16:1}. Содержание ГЦ-пар в ДНК составляет 58,5 мол.%.

Типовой штамм ИБ 1.1 выделен из нефтезагрязненной почвы Туруханского района Красноярского края и депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (VKM В-2935^T) и Испанской коллекции типовых культур (CECT 9091^T).

Описание штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4

Выделение, культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства

Из образцов пахотных почв Республики Башкортостан выделено 8 изолятов, подавляющих рост микроскопических грибов, среди которых два одновременно обладали антагонистической активностью по отношению к *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria alternata* и представителям р. *Fusarium*. Один из них по совокупности культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств был предварительно идентифицирован как *Pseudomonas* sp. ИБ-4 и депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (В-2830D).

Клетки – мелкие палочки 0,6-1,2 мкм, с закругленными концами, подвижные. Грамотрицательные, аэробные, неспорообразующие бактерии. Колонии на питательном агаре слизистые с блестящей поверхностью, прозрачные, слегка тянущиеся за петлей,

круглые, выпуклые с ровными краями диаметром до 5 мм. На картофельно-глюкозном агаре колонии плоские с неровными краями, непрозрачные, цвета слоновой кости, маслянистой и мягкой консистенции. Каталазоположительные, не образуют оксидазу и дегидрогеназу. Метаболизм – дыхательный, способны к денитрификации. Гидролизуют казеин, не гидролизуют желатину и лецитин. Способны к росту на среде с твин 80. Оптимальная температура роста 28°C. Способны использовать как источник углерода D-глюкозу, D-сахарозу, маннит, фруктозу, глицерин, мальтозу, декстрин, D-ксилозу, D-маннозу, D-галактозу, лактозу, D-рамнозу, мезо-инозитол, капронат, капилат, манитол, малонат, L-инозит, цистеин, этанол, леван, крахмал, α-кетоглутарат, изомаляновую, малеиновую, сульфаниловую, пропионовую, лимонную и α-аминобензойную кислоты. Не используют в качестве субстрата арабинозу, сорбит, пировиноградную, янтарную, шавелевую и муравьиновую кислоты. Образуют флуоресцирующий пигмент на среде Кинг Б.

Генотипическая характеристика штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4

Анализ гена 16S рРНК. Результаты определения и сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК (1381 п.н., GenBank KP306893) свидетельствуют о том, что наиболее близкородственным видом для изучаемого микроорганизма является штамм *P. koreensis* Ps 9-14^T (99,71% сходства), с которым он образует один кластер на филогенетическом древе (рис. 4).

Анализ гена, кодирующего β-субъединицу ДНК-гиразы. В качестве альтернативного филогенетического маркера была определена и проанализирована нуклеотидная последовательность гена *gyrB* у *Pseudomonas* sp. ИБ-4 (760 п.н., GenBank MN074863). Выявлена невысокая степень сходства с аналогичными последовательностями нескольких нетиповых штаммов рода *Pseudomonas* (96% со штаммом *P. fluorescens* Pf 0-1, 93% со штаммом *P. chlororaphis* PA23). Значимой гомологии с последовательностью гена *gyrB* штамма *P. koreensis* Ps 9-14^T обнаружено не было.

ДНК-ДНК-гибридизация. Уровень гибридизации тотальных геномов штаммов *Pseudomonas* sp. ИБ-4 и *P. koreensis* Ps 9-14^T (штамм получен из Корейской коллекции сельскохозяйственных культур (КАСС 10848)) составил 71%. Такой результат допускает видовое сходство этих микроорганизмов.

Содержание ГЦ-пар в ДНК штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4 составляет 61,5 мол.%, у штамма *P. koreensis* Ps 9-14^T – 60,7 мол.% (Kwon et al., 2003). Такие близкие значения могут указывать на то, что сравниваемые микроорганизмы относятся к одному виду.

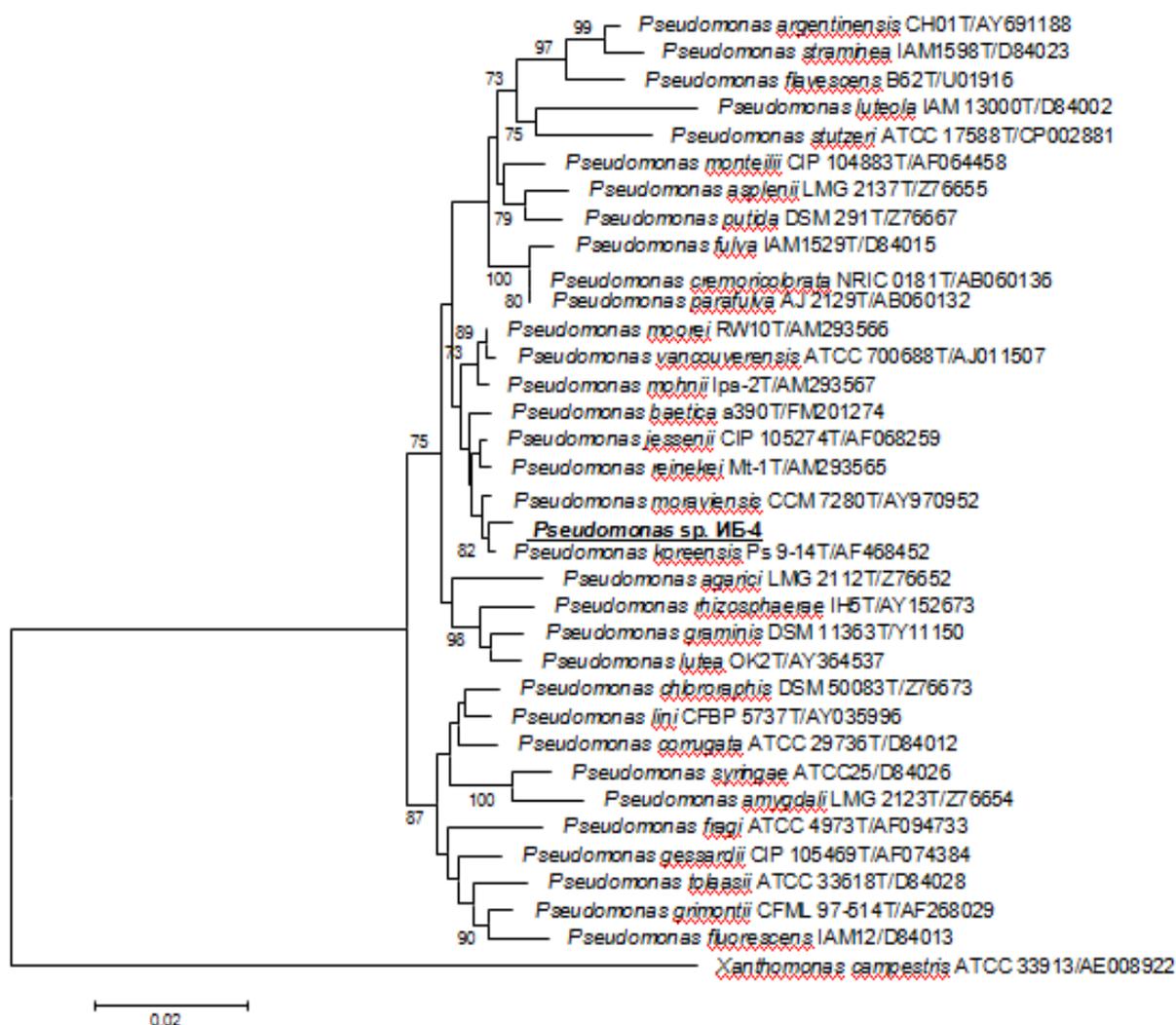


Рисунок 4 – Филогенетическое положение штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4 на основании анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Дендрограмма построена методом Neighbor-Joining (Saitou, Nei, 1987) с использованием 2-х параметрической модели Кимура (Kimura, 1980). Масштаб – 2 замены на каждые 100 нуклеотидов. Статистическая достоверность порядка ветвления определена с помощью “bootstrap”-анализа (приведены значения “bootstrap”-анализа выше 70%)

Хемотаксономические особенности штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4

Анализ жирных кислот. Доминирующими соединениями штамма ИБ-4 являлись гексадекановая $C_{16:0}$ (32,4%), цикло-гептадекановая $C_{17:0}$ *cyclo* (29,9%) (это вещество не относится к числу доминирующих у представителей р. *Pseudomonas*), *цис*-11-октадеценная $C_{18:1w7}$ (11,2%) и гексадеценная $C_{16:1}$ (8,3%) жирные кислоты. У штамма *P. koreensis* Ps 9-14^T, эти вещества представлены в количестве 24,7, 16,3, 18,9 и 23,1% соответственно.

Профиль клеточных белков. Полученный МАЛДИ-масс-спектр белковой фракции клеток штамма ИБ-4 позволил достоверно определить его принадлежность к р. *Pseudomonas*.

Анализ хинонов. Доминирующим хиноном штамма *Pseudomonas* sp. ИБ-4 является убихинон Q9, типичный для представителей р. *Pseudomonas* (Palleroni, 2005).

Т.о., на основании культурально-морфологических, физиолого-биохимических свойств, сравнительного анализа последовательности гена 16S рРНК, уровня ДНК-ДНК-гибридизации, содержания ГЦ-пар в молекуле ДНК, штамм *Pseudomonas* sp. ИБ-4 был отнесен к виду *P. koreensis*.

Профиль жирных кислот штамма *Paenibacillus ehimensis* ИВ 739

Штамм *Paenibacillus ehimensis* ИВ 739 поддерживается в коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН. Он продуцирует различные биологически активные вещества (Усанов и др., 1989, 1990; Мелентьев, Актуганов, 1999; Актуганов и др., 2003; Федорова и др., 2011; Худайгулов и др., 2011) и обладает антигрибной и фитогормональной активностью (Патент РФ № 1743019; Архипова и др., 2006; Мелентьев, 2007). Но таксономическое описание такого важного с практической точки зрения микроорганизма было неполным без сведений о составе жирных кислот клеточной стенки. В настоящей работе этот пробел был восполнен.

Всего у штамма *P. ehimensis* ИВ 739 идентифицировано 19 соединений с длиной цепи от 14 до 20 атомов углерода. Доминирующей являлась антеизо-пентадекановая кислота *anteiso-C*_{15:0} (46,5%), что характерно для р. *Paenibacillus* (Lee et al., 2004). Следующими по содержанию были антеизо-гептадекановая *anteiso-C*_{17:0} (20,5%) и гексадекановая *C*_{16:0} (9,0%) кислоты. У типового штамма вида *P. ehimensis* КСТС 3748^Т также превалировала антеизо-пентадекановая кислота (52,9%), но количество гексадекановой кислоты и антеизо-гептадекановой было близко (7,1% и 8,0% соответственно) (Lee et al., 2004). Насыщенные кислоты, такие как, тетрадекановая *C*_{14:0} (0,9%), пентадекановая *C*_{15:0} (0,5%), гептадекановая *C*_{17:0} (0,1%), октадекановая *C*_{18:0} (2,3%) и эйкозановая *C*_{20:0} (0,1%) выявлены только у штамма *P. ehimensis* ИВ 739. Соединения с разветвленной углеродной цепью (*iso-C*_{15:0}, *iso-C*_{16:0} и *iso-C*_{17:0}) присутствуют в спектре жирных кислот как у изучаемого (6,8%, 2,4% и 5,2% соответственно), так и у штамма *P. ehimensis* КСТС 3748^Т (8,1%, 8,6% и 3,3% соответственно) (Lee et al., 2004). Идентифицированы изомеры октадеценновой кислоты с разным положением двойной связи, содержание которых практически одинаково – *C*_{18:1w9} (1,7%) и *C*_{18:1w7} (1,6%) и октадекадиеновая кислота *C*_{18:2} (0,9%).

В главе 9 описаны биотехнологически значимые свойства микроорганизмов консорциума, а также штаммов *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^Т и *P. koreensis* ИБ-4.

Окислительная активность консорциума, входящих в его состав микроорганизмов и штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^Т

Окислительная активность консорциума и входящих в его состав микроорганизмов оказалась значительной в отношении большинства использованных субстратов (табл. 1). Величина этого показателя у индивидуальных штаммов ниже, чем у консорциума. Способность к окислению углеводов и их производных у штамма *A. calcoaceticus* ИБ

ДТ-5.1/1 выше, чем у *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, за исключением циклических соединений и, вероятно, является определяющей величиной для консорциума в целом.

Таблица 1 – Окислительная активность консорциума и образующих его штаммов

| Источник углерода | Окислительная активность, мг CO ₂ /г субстрата | | |
|-------------------|---|-------------------------------------|-----------------------------------|
| | Консорциум | <i>A. calcoaceticus</i> ИБ ДТ-5.1/1 | <i>O. intermedium</i> ИБ ДТ-5.3/2 |
| Гептан | 170±14 | 113±8 | 77±4 |
| Декан | 140±11 | 104±7 | 33±2 |
| Ундекан | 175±14 | 161±13 | 94±6 |
| Додекан | 181±15 | 153±12 | 116±8 |
| Циклогексан | 110±8 | 90±6 | 99±6 |
| Фенол | 43±2 | 30±2 | 36±2 |
| Бензол | 96±6 | 69±3 | 85±5 |
| Метилбензол | 89±5 | 81±5 | 93±6 |
| 1,2-диметилбензол | 100±7 | 92±6 | 76±4 |
| Гексадеканол | 219±18 | 215±18 | 91±6 |
| Изопропанол | 89±5 | 71±4 | 62±3 |
| Нафталин | 92±6 | 53±2 | 88±5 |
| Нефть | 144±11 | 112±8 | 84±5 |
| Дизельное топливо | 163±13 | 138±10 | 60±3 |
| Смазочное масло | 120±9 | 104±7 | 99±6 |
| Парафин | 177±14 | 127±9 | 111±1 |

Величина окислительной активности штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T была достаточно значительной независимо от используемого субстрата и температуры культивирования (исключение – фенол), хотя при 8°С этот показатель был выше, чем при 26°С (табл. 2). Наиболее полно идет окисление нефти (169 мг CO₂/г субстрата при 8°С и 155 мг CO₂/г субстрата при 26°С) и дизельного топлива (162 мг CO₂/г субстрата при 8°С и 116 мг CO₂/г субстрата при 26°С), содержащих в своем составе сложные смеси углеводов различных классов.

Окисление углеводов микроорганизмами связано с наличием у них ферментной системы оксигеназ, включающей атом кислорода из его молекулярной формы в концевую метильную группу углеводорода. Поэтому, вероятно, способность штаммов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1, *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 и *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T к окислению углеводов до CO₂ и H₂O объясняется высокой активностью их оксигеназного ферментного комплекса. Благодаря этой особенности изучаемые бактерии могут применяться в биотехнологии в качестве основы биопрепаратов для очистки окружающей среды от нефти и нефтепродуктов.

Таблица 2 – Окислительная активность микроорганизмов *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T

| Источник углерода | Окислительная активность, мг CO ₂ /г субстрата | |
|-------------------|---|--------|
| | 8°C | 26°C |
| Гептан | 134±10 | 88±4 |
| Декан | 130±9 | 102±5 |
| Ундекан | 148±11 | 127±9 |
| Додекан | 137±10 | 123±8 |
| Гексадекан | 141±10 | 113±7 |
| Циклогексан | 109±6 | 92±6 |
| Фенол | 74±4 | 39±2 |
| Бензол | 106±5 | 95±6 |
| Метилбензол | 137±10 | 95±6 |
| 1,2-диметилбензол | 137±10 | 85±4 |
| Нафталин | 120±8 | 95±6 |
| Изопропанол | 116±7 | 92±5 |
| Деканол | 120±8 | 106±5 |
| Нефть | 169±12 | 155±12 |
| Дизельное топливо | 162±12 | 116±7 |
| Смазочное масло | 134±10 | 113±7 |

**Нитрогеназная активность штаммов *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2,
P. turukhanskensis ИБ 1.1^T и *P. koreensis* ИБ-4**

Имеющиеся литературные данные (Ваккеро-Коузова, 2007; Ngom et al., 2004; Trujillo et al., 2005), позволили выдвинуть гипотезу о том, что штамм *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 способен к фиксации атмосферного азота. Также известно, что в холодном климате в ризосфере растений diaзотрофные бактерии р. *Pseudomonas* преобладают над представителями других таксономических групп азотфиксирующих микроорганизмов (Боронин, 1998; Моргун и др., 2009; Hoover, Pikuta, 2010). Поэтому была изучена нитрогеназная активность штамма *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 и *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T при культивировании в условиях комнатной и низкой положительной температуры (26°C и 8°C), различных источниках углерода, таких как маннит (контроль), декан, толуол и 2-метилнафталин, а также степень биodeградации этих соединений и динамика численности микроорганизмов в процессе азотфиксации (табл. 3 и 4).

Таблица 3 – Численность микроорганизмов штамма *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, его нитрогеназная активность и степень биodeградации углеводов в процессе азотфиксации

| Источник углерода | Титр, КОЕ/мл | | Нитрогеназная актив-ть, мкг N ₂ /мл/ч | | Биodeградация углеводов, % | |
|-------------------|---------------------------|---------------------------|--|------------|----------------------------|----------|
| | 8°C | 26°C | 8°C | 26°C | 8°C | 26°C |
| Маннит | (2,9±0,2)·10 ⁶ | (1,8±0,1)·10 ⁷ | 0,14±0,01 | 0,19±0,01 | – | – |
| Декан | (6,7±0,2)·10 ⁶ | (8,3±0,4)·10 ⁶ | 0,31±0,02 | 0,06±0,005 | 53,7±1,5 | 88,6±3,5 |
| Метилбензол | (9,6±0,4)·10 ⁶ | (3,0±0,2)·10 ⁶ | 0,44±0,03 | 0,19±0,01 | 56,3±1,8 | 95,4±5,2 |
| 2-метилнафталин | (3,0±0,1)·10 ⁶ | (4,7±0,3)·10 ⁶ | 0,24±0,01 | 0,02±0,001 | 18,5±1,1 | 25,0±1,8 |

Примечание: начальный титр бактериальной суспензии при 8°C – 3,3·10⁵ КОЕ/мл, при 26°C – 2,8·10⁵ КОЕ/мл

Оба штамма обладают нитрогеназной активностью, причем при 8°C она была выше, чем при 26°C. В ходе эксперимента численность микроорганизмов *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 и *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T возрастала на один порядок при 8°C и 26°C. В процессе азотфиксации происходила биodeградация углеводов: у штамма *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 она была эффективнее при комнатной, а у штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T – при низкой положительной температуре.

Таблица 4 – Численность микроорганизмов штамма *P. turukhanskensis* ИБ1.1^T, его нитрогеназная активность и степень биodeградации углеводов в процессе азотфиксации

| Источник углерода | Титр, КОЕ/мл | | Нитрогеназная актив-ть, мкг N ₂ /мл/ч | | Биodeградация углеводов, % | |
|-------------------|---------------------------|---------------------------|--|------------|----------------------------|----------|
| | 8°C | 26°C | 8°C | 26°C | 8°C | 26°C |
| Маннит | (7,2±0,2)·10 ⁶ | (6,0±0,2)·10 ⁶ | 0,17±0,01 | 0,08±0,005 | – | – |
| Декан | (2,4±0,1)·10 ⁶ | (1,6±0,1)·10 ⁶ | 0,09±0,006 | 0,03±0,001 | 71,2±4,3 | 56,3±3,3 |
| Метилбензол | (1,4±0,1)·10 ⁶ | (4,3±0,3)·10 ⁶ | 0,26±0,02 | 0,12±0,01 | 67,3±4,1 | 52,0±4,6 |
| 2-метилнафталин | (9,7±0,4)·10 ⁶ | (7,7±0,3)·10 ⁶ | 0,35±0,02 | 0,25±0,02 | 43,0±2,5 | 22,0±1,3 |

Примечание: начальный титр бактериальной суспензии при 8°C – 1,4·10⁵ КОЕ/мл, при 26°C – 7,7·10⁵ КОЕ/мл

У штамма *P. koreensis* ИБ-4 не было обнаружено окислительной активности, поэтому при исследовании его азотфиксирующей способности в качестве источника углерода использовали только маннит. Микроорганизм обладал высокой нитрогеназной активностью при комнатной температуре ((0,65±0,02) мкг N₂/мл/ч), сопоставимой с таковой у известных азотфиксаторов из Всероссийской коллекции микроорганизмов – *Azotobacter vinelandii* В-1617 и *A. chroococcum* В-1616 ((0,64±0,03) и 0,66±0,02) мкг N₂/мл/ч соответственно).

Далее исследовали как влияет инокуляция бактериями *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 или *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T на потенциальную нитрогеназную активность почвы. Установлено, что у проб, обработанных микроорганизмами, она была значительно выше, чем у

контрольных образцов, содержащих только эндогенную микробиоту, как при 8°C, так и при 26°C (табл. 5 и 6).

Таблица 5 – Потенциальная нитрогеназная активность почвенных образцов с эндогенной микробиотой и инокулированных бактериями *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2

| Источник углерода | Потенциальная <u>нитрогеназная</u> активность почвы, мг N ₂ /кг/ч | | | |
|-------------------|--|------------------|---------------|------------------|
| | 8°C | | 26°C | |
| | До инокуляции | После инокуляции | До инокуляции | После инокуляции |
| Маннит | 1165±95 | 1303±101 | 990±76 | 2040±140 |
| Декан | 1016±75 | 2075±156 | 959±77 | 1852±115 |
| Метилбензол | 1074±84 | 2011±150 | 1173±84 | 2523±159 |
| 2-метилнафталин | 950±68 | 2349±168 | 1646±126 | 2222±146 |

Таблица 6 – Потенциальная нитрогеназная активность почвенных образцов с эндогенной микробиотой и инокулированных бактериями *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^Г

| Источник углерода | Потенциальная <u>нитрогеназная</u> активность почвы, мг N ₂ /кг/ч | | | |
|-------------------|--|------------------|---------------|------------------|
| | 8°C | | 26°C | |
| | До инокуляции | После инокуляции | До инокуляции | После инокуляции |
| Маннит | 1165±95 | 1384±99 | 990±76 | 1425±102 |
| Декан | 1016±75 | 1858±123 | 959±77 | 1340±103 |
| Метилбензол | 1074±84 | 1858±123 | 1173±84 | 1936±148 |
| 2-метилнафталин | 950±68 | 2049±148 | 1646±126 | 2235±178 |

Способность штамма *P. koreensis* ИБ-4 к продукции фитогормонов

Известно, что некоторые представители р. *Pseudomonas* способны продуцировать цитокининоподобные вещества, гиббереллины и гетероауксины, стимулирующие рост и развитие растений (Pattern, Glick, 2002). Установлено, что штамм *P. koreensis* ИБ-4 вырабатывает такие фитогормоны, как ИУК и цитокининоподобные вещества на уровне (40±2) и (119±6) нг/мл культуральной жидкости соответственно.

Поверхностно-активные свойства штамма *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1

Показано, что многие представители р. *Acinetobacter* способны к выработке высокомолекулярных и низкомолекулярных сурфактантов, обладающих эмульгирующими и поверхностно-активными свойствами (Павлюковец и др., 2014; Pirog et al., 2017, 2018).

Клетки штамма *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 в процессе роста на среде Раймонда с гексадеканом продуцировали внеклеточные ПАВ, снижающие поверхностное натяжение жидкости до 39±1 мН/м, в то время как в контроле (чистой минеральной среде) этот

показатель был равен 64 ± 1 мН/м. Кроме того, синтезируемые клетками *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 биосурфактанты солюбилизируют гидрофобные субстраты – индекс эмульгирования (E_{24}) при смешивании супернатанта культуральной жидкости с подсолнечным маслом был 72%, с бензином – 62%, а при использовании дизельного топлива или смазочного масла – 55%.

Фитотоксичность бактериальных штаммов

Установлено, что культуральная жидкость каждого из штаммов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1, *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, *P. turukhanskensis* ИБ1.1^T, *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИВ 739 не оказывала угнетающего воздействия на семена горчицы белой.

Т.о., в ходе исследований выявлено, что консорциум и входящие в его состав микроорганизмы *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 обладают значительной окислительной активностью в отношении широкого круга углеводов, нефти и нефтепродуктов, причем величина этого показателя выше у консорциума. Высокая углеводородокисляющая активность выявлена у штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T, в т.ч. и при низкой положительной температуре. Обнаружена способность штаммов *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 и *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T к diazotрофии и увеличению потенциальной нитрогеназной активности почвы, даже при низкой положительной температуре. Показано, что штамм *P. koreensis* ИБ-4 обладает значительной нитрогеназной активностью, а также продуцирует фитогормоны – ИУК и цитокининподобные вещества. Выявлено, что штамм *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 синтезирует внеклеточные ПАВ, эмульгирующие гидрофобные углеводородные субстраты. Установлено отсутствие фитотоксических свойств у всех исследуемых бактериальных штаммов. Полученные данные позволяют сделать вывод о возможности применения консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, а также штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T в экологической биотехнологии в качестве основы биопрепаратов для очистки и восстановления окружающей среды от нефтезагрязнения, а штаммов *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИВ 739 – как дополнительных компонентов для ускорения этого восстановления.

В главе 10 описываются результаты лабораторных экспериментов по проверке эффективности применения изучаемых микроорганизмов для очистки различных объектов от загрязнения нефтяными углеводородами.

Очистка сточной воды, содержащей углеводороды, с помощью консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2

Сточная вода ОАО «Стеклонит» (г. Уфа) характеризуется присутствием взвешенных веществ, низкой численностью УОМ ($1,7 \cdot 10^3$ КОЕ/мл) и перед началом испытания содержала

различные загрязняющие вещества (трансформаторное масло, старин, вазелин и др.) в количестве 6,77 масс.%. Опыт проводили в колбах с минеральной средой Раймонда и сточной водой (1 масс.%), куда вносили консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 (титр клеток $3 \cdot 10^8$ КОЕ/мл). Инкубацию осуществляли на термостатируемой установке при 180 об/мин и 28°C в течение 15 сут. Объем системы 100 мл.

Внесение в сточную воду консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 привело к снижению содержания загрязняющих веществ на 83,16% и увеличению численности УОМ на один порядок к концу эксперимента (табл. 7). Под действием аборигенных микроорганизмов после завершения опыта степень биодеструкции составила только 37,22%, возрастание численности УОМ не отмечено.

Таблица 7 – Степень биодеградациии загрязняющих веществ и численность углеводородокисляющих микроорганизмов в сточной воде ОАО «Стеклонит»

| Время культивирования, сут | Вариант опыта | | | |
|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| | Сточная вода + консорциум | | Сточная вода (контроль) | |
| | Титр, КОЕ/мл | Степень биодеградациии, масс.% | Титр, КОЕ/мл | Степень биодеградациии, масс.% |
| 3 | $(6,1 \pm 0,8) \cdot 10^3$ | 48,30 | $(3,0 \pm 0,3) \cdot 10^3$ | 7,24 |
| 5 | $(4,0 \pm 1,2) \cdot 10^4$ | 73,85 | $(1,8 \pm 0,4) \cdot 10^4$ | 11,82 |
| 7 | $(5,3 \pm 0,2) \cdot 10^5$ | 76,07 | $(7,9 \pm 0,9) \cdot 10^4$ | 11,96 |
| 9 | $(1,2 \pm 0,3) \cdot 10^7$ | 77,25 | $(2,0 \pm 0,4) \cdot 10^5$ | 20,09 |
| 11 | $(8,0 \pm 2,2) \cdot 10^6$ | 80,94 | $(8,3 \pm 2,6) \cdot 10^4$ | 23,34 |
| 13 | $(1,4 \pm 0,4) \cdot 10^6$ | 82,86 | $(3,2 \pm 1,1) \cdot 10^4$ | 29,39 |
| 15 | $(1,6 \pm 2,5) \cdot 10^4$ | 83,16 | $(8,7 \pm 1,9) \cdot 10^3$ | 37,22 |

Биоремедиация грунтов, загрязненных нефтью, с помощью консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2

Эксперимент по биоремедиации грунтов месторождений Жетыбай и Каламкас (Республика Казахстан) (содержание нефтепродуктов 44,35 и 18,26% соответственно) проводили в сосудах объемом 3 л, в которые помещали по 1 кг грунта или грунта, смешанного с песком. С учетом высокой концентрации загрязнителя, грунт месторождения Жетыбай смешивали с песком в соотношениях 1:1 и 1:3, а грунт месторождения Каламкас – в соотношении 1:1. Консорциум микроорганизмов вносили дважды (в начале опыта и на 28-ые сут) в дозе $2 \cdot 10^8$ КОЕ/г субстрата. Дополнительно использовали комплексное минеральное удобрение (НРК) (0,25 г/г нефтепродукта). Длительность эксперимента 42 дня.

Обработка консорциумом, применение минерального удобрения и разбавление песком способствовали повышению численности гетеротрофных микроорганизмов в грунтах обоих месторождений на 3 порядка с $(3-5) \cdot 10^7$ до $(3-4) \cdot 10^{10}$ КОЕ/г и увеличению количества

УОМ с $(5-7) \cdot 10^6$ до $(5-8) \cdot 10^8$ КОЕ/г. Степень биодеструкции нефтепродуктов в грунте месторождения Каламкас практически не зависела от его разбавления песком и по прошествии 6 недель эксперимента составила 42,2 и 46,5%. Тогда как в грунте месторождения Жетыбай степень разложения поллютанта достигала максимума (74,9%) при его перемешивании с песком в соотношении 1:3. Применение только консорциума снижало содержание поллютанта на 16,5% (табл. 8).

Таблица 8 – Изменение концентрации нефтепродуктов и степень биодеструкции загрязнения в грунтах месторождений Жетыбай и Каламкас

| Вариант опыта (добавки к грунту) | Содержание нефтепродуктов, % | | | | Степень биодегра- дации, % |
|-------------------------------------|------------------------------|------------|------------|------------|----------------------------------|
| | Начальное | 14 сут | 28 сут | 42 сут | |
| Месторождение Каламкас | | | | | |
| Контроль (грунт) | 18,26±1,81 | 18,04±1,62 | 18,00±1,92 | 17,95±1,61 | 1,7 |
| Песок (1:1) + консорциум | 9,90±0,77 | 7,45±0,68 | 6,52±0,62 | 5,30±0,49 | 46,5 |
| Консорциум | 17,55±1,79 | 14,48±1,13 | 12,62±1,18 | 10,14±0,99 | 42,2 |
| Месторождение Жетыбай | | | | | |
| Контроль (грунт) | 44,35±4,46 | 44,31±4,20 | 44,28±4,02 | 44,11±4,33 | 0,5 |
| Песок (1:3) + консорциум | 10,00±0,83 | 5,39±0,29 | 3,40±0,18 | 2,51±0,20 | 74,9 |
| Песок (1:1) + консорциум | 22,18±2,19 | 20,20±2,0 | 18,39±1,70 | 15,48±1,40 | 30,2 |
| Консорциум | 44,48±4,16 | 41,62±4,02 | 40,55±3,96 | 37,15±3,52 | 16,5 |

Биоремедиация нефтезагрязненного песка штаммом *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T

В сосуды объемом 1 л помещали 500 г песка, вносили сырую нефть (5 или 15 масс.%) и 100 мл суспензии микроорганизмов *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T с титром $2,2 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Культивирование проводили при 4-8°C. Длительность эксперимента 6 месяцев. Интродукцию бактерий осуществляли 1 раз в месяц.

Благодаря обработке штаммом *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T после завершения опыта содержание нефти снизилось до 0,8%, а степень биодеструкции поллютанта достигла 84% при исходном 5% уровне загрязнения. При 15%-ом загрязнении содержание загрязнителя уменьшилось до 4,5%, а степень биоразложения составила 70%. Дробное внесение бактерий позволило стабилизировать численность гетеротрофных микроорганизмов и УОМ в очищаемом песке на достаточно высоком уровне – 10^7 КОЕ/г (при начальном титре для обеих групп микроорганизмов менее 10^3 КОЕ/г), который не зависел от концентрации нефти. В образцах песка только с эндогенной микробиотой содержание поллютанта уменьшилось всего на 0,1% (в обоих случаях), а его биодеградация составила 2 и 0,7% (при 5 и 15% начальном загрязнении), количество гетеротрофных микроорганизмов увеличилось только на 1 порядок (с 10^2 до 10^3 КОЕ/г), а численность УОМ под влиянием контаминации нефтью в начале эксперимента возросла на 1-2 порядка, но потом опустилась на прежний уровень.

Применение комбинаций бактерии с различной функциональной активностью для снижения содержания нефти в почве и ускорения роста и развития растений

3 кг чернозема (глинисто-иллювиальный, общий гумус 4,2%; общий азот 0,5%; рН водной вытяжки 6,3) помещали в вегетационные сосуды и увлажняли до 60% от полной влагоемкости, после чего вносили нефть в количестве 3 или 6% (масс). Далее почву инокулировали суспензией микроорганизмов (каждый с титром $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл) в количестве 10 мл/кг, поливали водой и перемешивали. Использовали следующие суспензии: консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2; комбинацию 3-х штаммов (консорциум и *P. koreensis* ИБ-4 (1:1)); комбинацию 4-х штаммов (консорциум, *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИВ 739 (1:1:1)). Через 2 сут высевали предварительно замоченные семена овса (*Avena sativa* L.) (30 шт. на сосуд). Длительность эксперимента 42 сут. Регулярно производили учет численности микроорганизмов (гетеротрофные, азотфиксирующие, УОМ) и определение содержания нефтепродуктов в почве. После завершения эксперимента измеряли массу надземной части побега и корней и высоту стебля.

Разница в содержании нефти в почве не оказывала какого-либо существенного влияния на численность почвенной микробиоты, размерные и массовые показатели растений овса. Всхожесть семян была приблизительно одинаковой во всех вариантах опыта – 94-96%, но более дружной и ранней (на 2 дня) в почве, инокулированной бактериями. Начальный титр гетеротрофных микроорганизмов в почве составлял $(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^5$, азотфиксирующих – $(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^5$, УОМ – $(2,4 \pm 0,1) \cdot 10^4$ КОЕ/г. Обработка консорциумом микроорганизмов и комбинацией 3-х штаммов, повышала количество гетеротрофных и азотфиксирующих микроорганизмов к концу опыта на 2 порядка ($\sim 10^7$ КОЕ/г), а внесение комбинации 4-х штаммов – на 3 порядка ($\sim 10^8$ КОЕ/г). Титр УОМ во всех вариантах с интродукцией микроорганизмов увеличивался на 3 порядка к концу опыта ($\sim 10^7$ КОЕ/г). Нефть в целом угнетала рост побегов, стимулировала развитие корней и не оказывала существенного влияния на массу надземной части в вариантах без обработки микроорганизмами (табл. 9).

Внесение микроорганизмов ускоряло на 6-7 дней начало каждой стадии развития растений, а также оказывало положительное воздействие на их надземную часть. Самый значительный эффект на длину и массу побегов оказывала комбинация 4-х штаммов. Благодаря ее применению длина проростков увеличивалась на 27,4 и 23,4% (при 3 и 6% уровне загрязнения соответственно) по сравнению с проростками овса в незагрязненной почве и на 77,8 и 54,0% – по сравнению с растениями в почве с 3 и 6% содержанием нефти соответственно. Комбинация вызывала увеличение массы надземной части растений в 2,4-2,7 раза по сравнению с растениями овса в почве без нефти и по сравнению с растениями в почве с нефтезагрязнением (независимо от его содержания), но не обработанной суспензией.

Таблица 9 – Средние показатели длины проростков, массы корня и надземной части растений овса после обработки суспензиями микроорганизмов

| Вариант опыта, добавка к почве | Длина проростков, см | Масса корня, г | Масса надземной части, г |
|---------------------------------------|----------------------|----------------|--------------------------|
| + овес | 20,1±1,2 | 0,34±0,03 | 0,81±0,03 |
| + овес + нефть 3% | 14,4±0,7 | 0,76±0,02 | 0,73±0,02 |
| + овес + нефть 6% | 16,1±0,8 | 0,66±0,04 | 0,86±0,04 |
| + овес + нефть 3% + консорциум | 19,4±1,1 | 0,35±0,01 | 0,85±0,06 |
| + овес + нефть 6% + консорциум | 18,5±1,3 | 0,30±0,02 | 0,77±0,06 |
| + овес + нефть 3% + смесь 3-х штаммов | 22,3±0,6 | 0,67±0,05 | 1,43±0,06 |
| + овес + нефть 6% + смесь 3-х штаммов | 21,7±1,0 | 0,68±0,03 | 1,39±0,05 |
| + овес + нефть 3% + смесь 4-х штаммов | 25,6±0,9 | 0,44±0,02 | 1,91±0,08 |
| + овес + нефть 6% + смесь 4-х штаммов | 24,8±1,1 | 0,38±0,02 | 1,95±0,06 |

Это можно объяснить тем, что бактерии *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИВ 739 обладают способностью к продуцированию гормонов цитокининового ряда в количестве 119 и 190 нг/мл культуральной жидкости соответственно (Архипова и др., 2006), которые способствуют росту побегов, но ингибируют рост корней, поэтому комбинация из 4-х штаммов практически не увеличивает массу корней овса.

Комбинация 3-х штаммов тоже увеличивала длину побегов, но в меньшей степени – на 11,0 и 8,0% (при 3 и 6% уровне загрязнения соответственно) по сравнению с проростками в незагрязненной почве и на 54,9 и 34,8% – по сравнению с растениями в почве с 3 и 6% содержанием нефти соответственно. Масса надземной части растений возрастала в 1,6-2,0 раза по сравнению с растениями овса в почве без нефти и по сравнению с растениями в почве с нефтезагрязнением (независимо от его содержания), но не обработанной микроорганизмами. При этом ингибирования развития корней не происходило. Это, вероятно, вызвано меньшим количеством цитокининов, образуемых только бактериями *P. koreensis* ИБ-4. Кроме того, штамм синтезирует в небольших количествах ИУК (40 нг/мл культуральной жидкости) – гормон, стимулирующий рост корней, поэтому после обработки указанной комбинацией их масса была в 1,5 и 1,8 раза выше (при 3 и 6% загрязнении соответственно), чем при инокуляции комбинацией 4-х штаммов.

Внесение консорциума микроорганизмов способствовало увеличению длины проростков за счет уменьшения содержания нефти в почве (в 3,3 и 3,6 раза по сравнению с растениями в загрязненной почве), но не приводило к наращиванию массы подземной и надземной частей растений. Очевидно, это связано с отсутствием у указанных бактерий фитогормональной активности.

Инокуляция загрязненной почвы комбинациями из 3-х и 4-х штаммов уменьшала содержание в ней поллютанта в 3,1-3,5 раза по сравнению с вариантами с растениями, но без внесения бактерий (табл. 10). Посев растений овса без обработки почвы микроорганизмами снижал содержание нефтепродуктов также незначительно, как и эндогенная микробиота.

Таблица 10 – Содержание нефтепродуктов в почве

| Вариант опыта, добавка к почве | Содержание нефтепродуктов, % | |
|---------------------------------------|------------------------------|--------|
| | 21 сут | 42 сут |
| Почва без нефти | 0,003 | 0,003 |
| + нефть 3% | 2,81 | 2,22 |
| + нефть 6% | 5,44 | 5,12 |
| + овес + нефть 3% | 2,86 | 2,02 |
| + овес + нефть 6% | 5,33 | 4,94 |
| + овес + нефть 3% + консорциум | 1,39 | 0,61 |
| + овес + нефть 6% + консорциум | 2,36 | 1,36 |
| + овес + нефть 3% + смесь 3-х штаммов | 0,98 | 0,58 |
| + овес + нефть 6% + смесь 3-х штаммов | 2,26 | 1,46 |
| + овес + нефть 3% + смесь 4-х штаммов | 1,10 | 0,71 |
| + овес + нефть 6% + смесь 4-х штаммов | 2,76 | 1,59 |

Т.о. интродукция комбинаций, состоящих из бактерий с различной функциональной активностью, способствовала более ранней всхожести семян (на 2 сут), ускоряла на 6-7 сут начало всех стадий развития растений овса, увеличивала на 34,8-77,8% длину проростков и в 1,6-2,7 раза – их массу по сравнению с растениями в нефтезагрязненной почве, не обработанной микроорганизмами, а также снижала в почве содержание нефтепродуктов в 3,1-3,5 раза и увеличивала в ней количество гетеротрофных, азотфиксирующих и углеводородокисляющих микроорганизмов на 2-3 порядка. Это свидетельствует о возможности применения комбинаций, содержащих бактерии-нефтедеструкторы и микроорганизмы с ростстимулирующей активностью, для очистки почвы от нефти и ускорения ее восстановления.

Глава 11 посвящена результатам полевых экспериментов по проверке эффективности применения изучаемых микроорганизмов для очистки различных объектов окружающей среды от загрязнения нефтью и рекультивации нефтесодержащих отходов и их обсуждению.

Обезвреживание нефтешлама с помощью консорциума микроорганизмов

***A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedius* ИБ ДТ-5.3/2**

Промышленные испытания по обезвреживанию с помощью консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedius* ИБ ДТ-5.3/2 5 тыс. м³

нефтешлама (со средним содержанием нефтепродуктов 10,47%) проводили на территории месторождения Каражанбас (Республика Казахстан). Предварительно на участок однократно вносили комплексное минеральное удобрение (NPK) (0,26 кг/м³ отхода). До и после этой процедуры проводили рыхление и вспашку. Консорциум применяли один раз в дозе 0,056 кг/м³ нефтешлама, разводя сухой биопрепарат водой. На протяжении всего эксперимента с августа по ноябрь 2013 г. регулярно 1 раз в неделю производили вспашку участка.

После завершения испытания содержание нефтепродуктов в пробах, обработанных консорциумом микроорганизмов, снизилось на 4,99-8,64%, а в контрольном образце – только на 0,39% (табл. 11).

Таблица 11 – Численность гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов и концентрация нефтепродуктов в нефтешламе

| Проба | Количество микроорганизмов, КОЕ/г | | | | Содержание нефтепродуктов, % | |
|----------|-----------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|--------|
| | гетеротрофные | | углеводородокисляющие | | 1 сут | 90 сут |
| | 1 сут | 90 сут | 1 сут | 90 сут | | |
| Контроль | $(8,1 \pm 1,4) \cdot 10^4$ | $(8,5 \pm 0,9) \cdot 10^4$ | $(7,9 \pm 0,9) \cdot 10^3$ | $(8,4 \pm 1,6) \cdot 10^3$ | 10,47 | 10,08 |
| 1 | $(9,0 \pm 1,0) \cdot 10^4$ | $(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^7$ | $(9,6 \pm 1,8) \cdot 10^3$ | $(8,2 \pm 1,1) \cdot 10^4$ | 10,08 | 4,93 |
| 2 | $(7,1 \pm 0,8) \cdot 10^4$ | $(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^7$ | $(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^4$ | $(7,7 \pm 0,9) \cdot 10^5$ | 10,32 | 1,68 |
| 3 | $(7,9 \pm 0,7) \cdot 10^4$ | $(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^7$ | $(7,6 \pm 1,4) \cdot 10^3$ | $(1,6 \pm 0,4) \cdot 10^4$ | 9,84 | 3,84 |
| 4 | $(7,2 \pm 0,7) \cdot 10^4$ | $(4,0 \pm 0,3) \cdot 10^6$ | $(8,1 \pm 1,5) \cdot 10^3$ | $(3,0 \pm 0,1) \cdot 10^4$ | 9,63 | 4,64 |
| 5 | $(9,8 \pm 1,1) \cdot 10^4$ | $(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^8$ | $(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^4$ | $(1,3 \pm 0,2) \cdot 10^6$ | 10,17 | 4,31 |

После обработки консорциумом титр гетеротрофных микроорганизмов вырос на 2-4 порядка, а количество УОМ увеличилось на 1-2 порядка. Численность микроорганизмов учитываемых групп в контрольной пробе за время эксперимента практически не изменилась (табл. 11). Несмотря на то, что рекультивационные мероприятия начались в самом конце сезона и проводились при постепенном понижении среднесуточной температуры, консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 даже при однократном внесении хорошо зарекомендовал себя при обезвреживании нефтесодержащего отхода в сложных погодных-климатических условиях Республики Казахстан.

Очистка почвы от нефти в условиях низких положительных температур штаммом *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T

Эксперимент по очистке почвы от свежего разлива нефти проводили на территории Пуровского района ЯНАО с 22 августа по 21 сентября 2012 г. На ровном обводненном участке площадью 1,0 га с содержанием нефти 4,88% произвели обработку спецтехникой, внесение комплексного минерального удобрения (NPK) и биогенной добавки (дрожжевой автолизат). После этого его разделили на две равные части, одну из которых обработали

суспензией микроорганизмов психротолерантного штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T (1 м³, титр 2,0·10⁸ КОЕ/мл). В период испытания температура воздуха колебалась от 0 до 9°С.

Через две недели после начала эксперимента содержание нефтепродуктов в почве опытной части уменьшилось до 2,61%, а еще через две недели – до 0,44%. На контрольной части содержание загрязнителя к концу испытания существенно не изменилось (4,80%). Т.е., применение штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T способствует очистке почвы от нефти в условиях низких положительных температур Западной Сибири.

Биологическая рекультивация нефтесодержащего отхода с помощью консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, а также штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T

Эксперимент по биорекультивации отвалов нефтезагрязненной (отработанной) отбеливающей глины, которую используют как природный адсорбент при очистке масел, проводили на полигоне промышленных отходов ОАО «Орскнефтеоргсинтез» (Оренбургская обл.) с июня 2013 по июль 2014 г. Среднее содержание нефтепродуктов на первом участке составляло 7,12%, на втором – 22,76%. Начальная численность гетеротрофных и углеводородокисляющих микроорганизмов на обоих участках была менее 10⁴ КОЕ/г, а азотфиксирующих микроорганизмов – менее 10³ КОЕ/г. Участки были разбиты на делянки (1 м²), каждую из которых несколько раз обрабатывали суспензиями, содержащими или консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 или штамм *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T с титром 1·10⁸ КОЕ/мл каждая (1 л/м²).

С помощью микроорганизмов за год эксперимента количество нефтепродуктов на первом участке уменьшилось до 2,30-2,33%, на втором – до 10,57-10,82% (рис. 5).

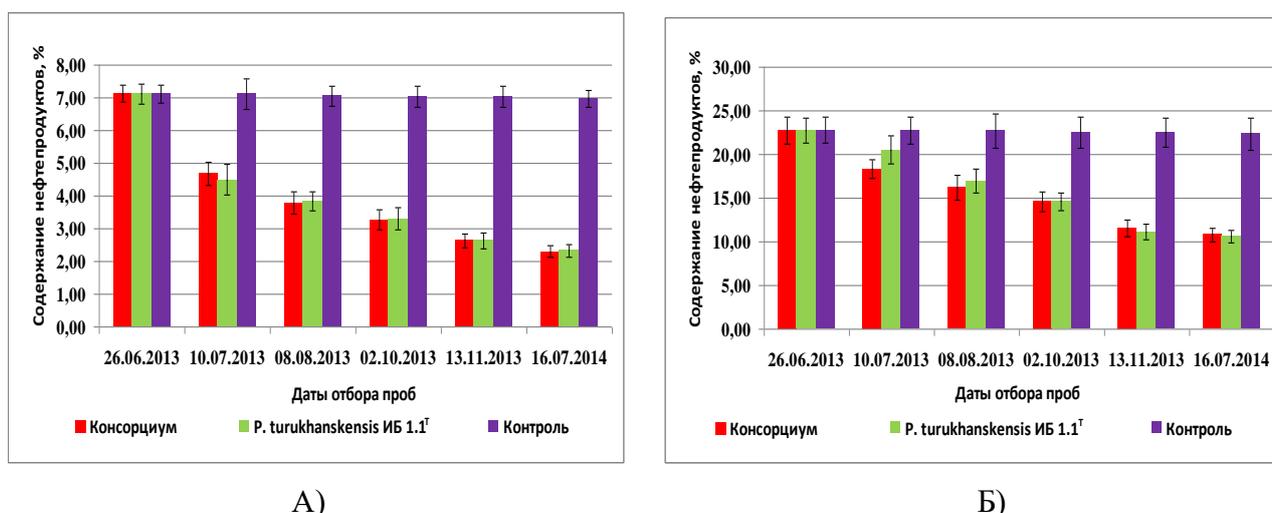


Рисунок 5 – Содержание нефтепродуктов в отработанной отбеливающей глине на слабозагрязненном (А) и сильнозагрязненном (Б) участках

Благодаря внесению бактерий на обоих участках к концу эксперимента удалось увеличить титр гетеротрофных (на первом участке – на 2 порядка при применении каждой суспензии, на втором – на один порядок с помощью консорциума и на 2 порядка – при интродукции штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T), углеводородокисляющих (на обоих участках на 1 порядок с помощью консорциума и на 2 порядка – при обработке штаммом *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T) и азотфиксирующих микроорганизмов (с помощью каждой суспензии на первом участке – на 3 порядка и на втором участке – на 2 порядка). На контрольных делянках деструкции нефтепродуктов и повышения численности микроорганизмов учитываемых групп практически не наблюдалось.

Всхожесть семена редиса в загрязненной отбеливающей глине была очень низкой (на первом участке 30%, на втором 16%). После применения консорциума и штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T на первом участке проросло 95 и 92% семян соответственно, а на втором участке в обоих вариантах опыта – 86% семян. На контрольных делянках на первом участке всхожесть увеличилась только на 10%, а на сильнозагрязненном участке почти не изменилась. Т.о. консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 и штамм *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T одинаково хорошо зарекомендовали себя в процессе биорекультивации отхода нефтехимической промышленности, снижая в нем содержание нефти, уменьшая фитотоксичность и повышая численность микроорганизмов основных эколого-трофических групп.

Биорекультивация почвы после нефтяного разлива с помощью консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, а также штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T

На месте нефтеразлива (Нефтеюганский район ХМАО – Югра, среднее содержание загрязнителя 70,3%) разбили делянки (1 м²), на которые однократно вносили суспензии, содержащие или консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 или штамм *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T с титром $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл каждая (1 л/м²). Продолжительность эксперимента с сентября 2013 г. по июнь 2015 г.

Эффективность суспензий микроорганизмов в начале и середине эксперимента была равной: интродукция каждой позволила к концу сентября 2013 г. сократить количество нефтепродуктов в почве до 45,6%, а в июне 2014 г. при использовании консорциума и штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T содержание углеводов составило 40,0 и 38,9% соответственно (рис. 6).

К концу эксперимента содержание нефтепродуктов на делянках, обработанных консорциумом, снизилось до 32,7%. Там, где применяли штамм *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T, разложение поллютантов проходило более активно и содержание углеводов уменьшилось до 23,3%. В тоже время, в почве только с аборигенной микробиотой, убыль загрязняющих веществ после завершения опыта была незначительной – 5,2%.

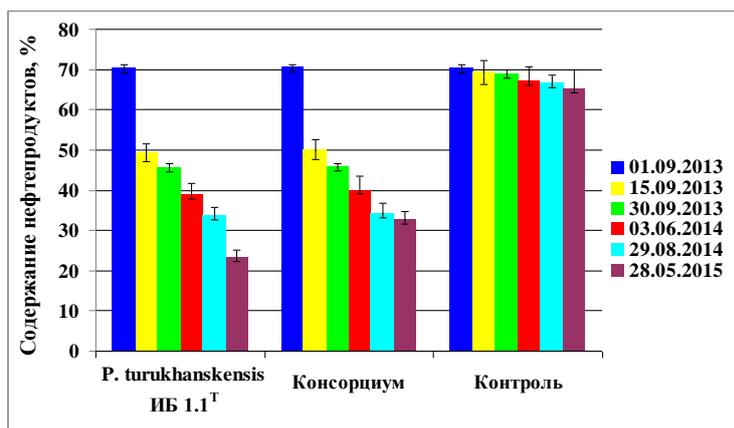


Рисунок 6 – Содержание нефтепродуктов в рекультивируемой почве

Нефтезагрязненная почва характеризовалась низким содержанием микроорганизмов (начальный титр гетеротрофных микроорганизмов $(2,9 \pm 0,2) \cdot 10^4$ КОЕ/г, УОМ – $(5,7 \pm 0,3) \cdot 10^3$ КОЕ/г). Под влиянием штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^Т количество микроорганизмов указанных групп увеличилось на 3 и 4 порядка, а благодаря использованию консорциума – на 2 и 3 порядка соответственно. На контрольных делянках повышения численности микроорганизмов учитываемых групп не наблюдалось.

Т.о., установлено, что однократная интродукция как консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, так и штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^Т ускоряет процесс биодegradации углеводов в высокозагрязненной почве и способствует увеличению в ней численности микроорганизмов основных экологотрофических групп. Лучшие результаты достигнуты за счет внесения психротолерантного штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^Т, с помощью которого за 21 месяц экспозиции удалось снизить содержание нефтепродуктов в почве с 70,3 до 23,3% и увеличить количество гетеротрофных (на 3 порядка) и углеводородокисляющих микроорганизмов (на 4 порядка). Полученные данные позволяют рекомендовать этот штамм для очистки нефтезагрязненных грунтов в зоне холодного и умеренного климата.

Очистка водной поверхности болота от нефти с помощью консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2

После аварии в мае 2015 г. содержание нефти в непроточном болоте площадью 400 м² и глубиной 1-1,2 м на территории Пуровского района ЯНАО составило 14,6%. Для очистки объекта 4 л суспензии консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 с титром $1,8 \cdot 10^8$ КОЕ/мл разводили в 100 л водопроводной воды и помпой равномерно наносили (разбрызгивали) на поверхность водоема. После этого производили аэрирование водного объекта путем принудительного забора воды при помощи насоса со скоростью 20 м³/час, которую затем подавали через систему трубопроводов на поверхность загрязненного пленкой нефти болота. Дневная температура при проведении

рекультивации была 14-20°C. Однократное внесение консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 снизило содержание загрязнителя через четыре недели до 0,4%. Степень биодеструкции нефти составила 97,3%.

В главах 12 и 13 описываются технологии производства и применения биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»®.

Описание биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»®

В результате проведенных исследований была разработана серия полифункциональных биопрепаратов-нефтедеструкторов под торговой маркой «Ленойл»®, на которую получено Свидетельство на товарный знак. Серия включает в себя биопрепараты «Ленойл»®, СХП, «Ленойл»® – супер, СХП, «Ленойл»® – гранд, СХП и «Ленойл»® – NORD, СХП, предназначенные для очистки различных объектов окружающей среды от нефтяного загрязнения, обезвреживания нефтесодержащих отходов и восстановления почв. Биопрепарат «Ленойл»® – NORD, СХП, помимо прочего, может применяться в условиях низких положительных температур Западной Сибири.

Биопрепараты представляют собой сухие порошки (СХП) от светло-кремового до коричневого цвета, со специфическим, свойственным микробному препарату запахом, основа которых – жизнеспособные клетки непатогенных штаммов микроорганизмов, растущие на нефти и дизельном топливе. В состав биопрепарата «Ленойл»®, СХП входят клетки микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2; в состав «Ленойл»® – супер, СХП – клетки микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1, *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 и *P. koreensis* ИБ-4; в состав «Ленойл»® – гранд, СХП – клетки микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1, *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИБ 739; в состав биопрепарата «Ленойл»® – NORD, СХП входят клетки микроорганизма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^Г. Помимо окислительной активности, свойственной биопрепарату «Ленойл»®, СХП, биопрепараты «Ленойл»® – супер, СХП и «Ленойл»® – гранд, СХП обладают нитрогеназной, нитрогеназной и ростстимулирующей активностью соответственно. Биопрепарат «Ленойл»® – NORD, СХП обладает окислительной активностью, в т.ч. при низких положительных температурах.

В состав биопрепаратов вместе с действующими микробными штаммами входит незначительное количество компонентов сред для выращивания микроорганизмов, а также наполнитель (для СХП). Сухая препаративная форма пригодна для длительного хранения (срок годности 2 года). Биопрепараты производятся также и в виде культуральной жидкости с титром жизнеспособных клеток не менее $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл (срок хранения до 3-х месяцев).

Согласно заключениям по токсикологической оценке, биопрепараты серии «Ленойл»® относятся к 4 классу опасности, вещества малоопасные.

Технологическая схема промышленного производства биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»®

Разработаны и утверждены технические условия на биопрепараты «Ленойл»® СХП, «Ленойл»® – супер, СХП и «Ленойл»® – гранд, СХП (титр не менее $1 \cdot 10^8$ КОЕ/г) (ТУ 9291-001-33822935-2012) и на биопрепарат «Ленойл»® – NORD, СХП (титр не менее $1 \cdot 10^8$ КОЕ/г) (ТУ 9291-007-33822935-2014), а также регламенты их промышленного получения.

Создана и внедрена технология промышленного производства биопрепаратов серии «Ленойл»® в виде культуральной жидкости и сухого порошка, которое осуществляет ЗАО НПП «Биомедхим» (г. Уфа). С июня 2012 г. было получено более 384200 л этих биопрепаратов в жидком виде и более 75210 кг – в сухом. На рисунке 7 представлена принципиальная технологическая схема промышленного производства биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»®.

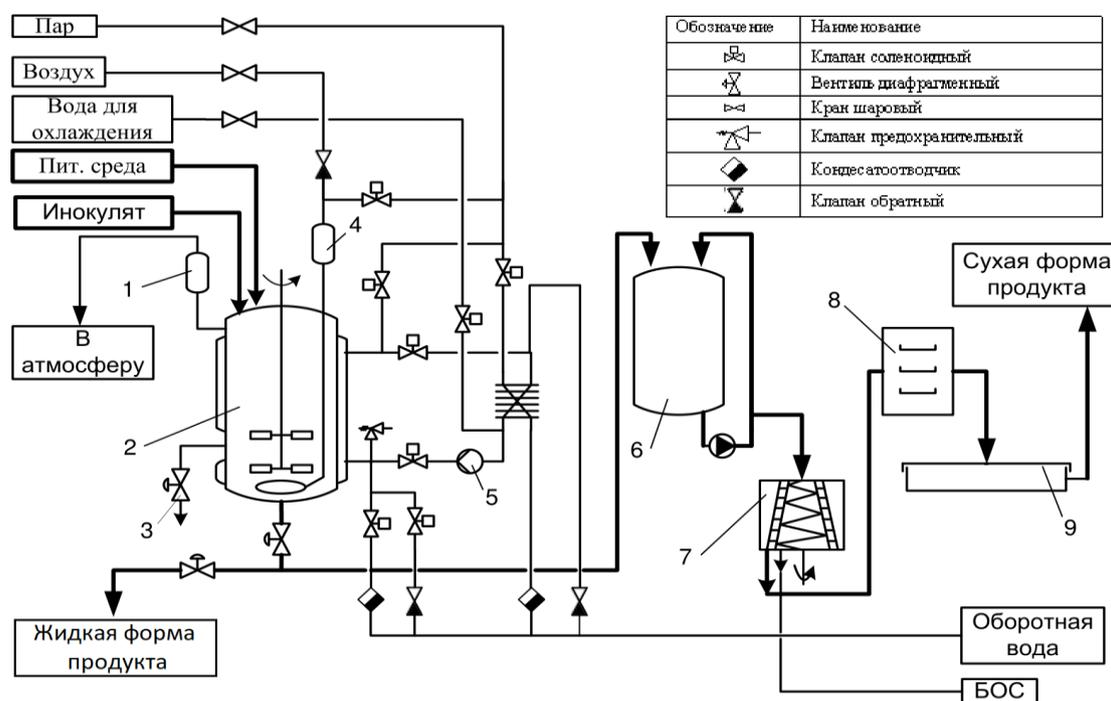


Рисунок 7 – Принципиальная технологическая схема промышленного производства биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»®. 1 – фильтр тонкой очистки на линии удаления воздуха; 2 – ферментер; 3 – пробоотборник; 4 – фильтр тонкой очистки на линии подачи воздуха в ферментер; 5 – циркуляционный насос; 6 – накопительная емкость для культуральной жидкости; 7 – сепаратор; 8 – морозильная камера; 9 – лиофильная сушилка

Чистую культуру углеводородокисляющих микроорганизмов из пробирки с агаризованной питательной средой Раймонда путем смыва стерильной водопроводной водой пересеивают в лабораторный ферментер (12 л) со стерильной жидкой средой Раймонда (9 л) и дизельным топливом (1%) и выращивают при температуре 28°C, перемешивании 180 об/мин, с подачей стерильного воздуха (0,6 л/мин на 1 л среды) в течение 48 ч. Конечный титр готового инокулята должен быть не менее $4 \cdot 8 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Далее осуществляют

стерилизацию технологической системы для наработки биопрепарата и готовят питательную среду (1000 л) для культивирования микроорганизмов в производственном ферментере (1350 л), которую затем стерилизуют в ферментере и добавляют расчетное количество дизельного топлива. Засевают производственный ферментер подготовленным инокулятом и выращивают в нем микроорганизмы в течение 72 ч при 28°C, перемешивании 160 об/мин и с подачей стерильного воздуха не менее 36 м³/ч. Температурный режим поддерживают подачей воды (35°C) в рубашку ферментера. Для контроля процесса культивирования, каждые 12 ч производят отбор проб для определения промежуточных значений pH среды и титра клеток. Готовый жидкий продукт (титр не менее 10⁹ КОЕ/мл) разливают в пластиковую тару.

Для приготовления сухого биопрепарата бактериальную суспензию концентрируют на сепараторе-разделителе. К полученной биомассе микроорганизмов с титром не менее 1·10¹⁰ КОЕ/г добавляют криопротектор и замораживают при -24°C, после чего помещают в лиофильную сушилку (-30...-50°C). К лиофилизату с титром микроорганизмов не менее 1·10¹¹ КОЕ/г добавляют наполнитель (отруби, сухие дрожжи или коалин). Готовый сухой продукт с титром микроорганизмов не менее 1·10⁸ КОЕ/г расфасовывают в бумажные мешки.

Сухие препараты бактерий *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИВ 739 производят по такой же схеме, внося при культивировании в лабораторном ферментере пеногаситель и не добавляя дизельное топливо. Для выращивания клеток *P. koreensis* ИБ-4 питательную среду Раймонда заменяют на среду Кинг Б, а для наработки жидкой культуры *P. ehimensis* ИВ 739 используют среду К1 (Федорова и др., 2011) и устанавливают температуру 37°C.

Биопрепарат «Ленойл»® – супер, СХП получают путем смешивания сухого препарата консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 и сухого препарата *P. koreensis* ИБ-4 в соотношении 1:1; биопрепарат «Ленойл»® – гранд, СХП получают путем смешивания сухих препаратов консорциума микроорганизмов, *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИВ 739 в соотношении 1:1:1.

Технология применения биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»®

Наиболее эффективным способом применения биопрепарата из серии Ленойл»® является внесение его в грунт в виде рабочей суспензии с минеральными добавками с периодичностью 1 раз в 25-30 дней (1-4 раза за сезон) в зависимости от степени загрязнения и длительности вегетационного периода под поверхностную обработку (вспашка, рыхление, дискование) методом дождевания. Биопрепараты можно использовать при среднесуточных температурах воздуха 10-40°C («Ленойл»®, СХП, «Ленойл»® – супер, СХП и «Ленойл»® – гранд, СХП) или 0-20°C («Ленойл»® – NORD, СХП).

Для интенсификации деструкции углеводов рекомендуется внесение в загрязненный грунт биогенных добавок (жидкий дрожжевой автолизат) из расчета 1 л на 1 кг

сухого биопрепарата из серии Ленойл®. Для создания оптимального водно-воздушного режима для микроорганизмов в рекультивируемом объекте предлагается внесение органического субстрата (старая солома, силос и т.п.) в количестве 30% от массы нефтепродуктов, а также постоянное рыхление и полив участка. Для развития УОМ необходима подкормка минеральными удобрениями. Наиболее оптимально использовать комплексное азотно-фосфорно-калийное минеральное удобрение из расчета 10 кг на 1 т нефтепродуктов. Внесение минеральных удобрений, биогенных добавок и органического субстрата следует производить перед каждой обработкой рабочей суспензией биопрепарата. Возможен посев на рекультивируемом участке травосмеси многолетних трав.

При незначительном слое загрязненной почвы – до 30 см и обеспечении кислородного режима, а также элементами минерального питания биопрепарат из серии Ленойл® способен за летний период практически полностью разложить нефтяные углеводороды при их концентрации не более 10% и на 80-87% – при концентрации от 10 до 30%. При содержании нефтепродуктов свыше 30% необходимо снизить их концентрацию методом перемешивания загрязненной почвы с измельченной соломой, опилками.

Очистка водных поверхностей от нефти и нефтепродуктов заключается во внесении в загрязненную воду рабочей суспензии биопрепарата из серии «Ленойл»® с принудительной аэрацией водного объекта (Патент РФ № 2627598).

В процессе рекультивации очищаются грунт и песок, загрязненные нефтью или нефтепродуктами, а также обезвреживаются нефтесодержащие отходы (нефтезагрязненная отбеливающая глина, нефтешлам).

Приготовление рабочей суспензии из сухого биопрепарата. 1 кг сухого биопрепарата из серии Ленойл® и 0,1 кг комплексной минеральной добавки для усиления процессов жизнедеятельности микроорганизмов-нефтедеструкторов (например, «Аммофос» ГОСТ 18918-85) разводят в 200 л технической воды, тщательно перемешивают и вносят 0,2 л дизельного топлива для обеспечения нормальной жизнедеятельности микроорганизмов. Выдерживают 24 ч при температуре 20-25°C, периодически перемешивая, потом разбавляют в 10 раз. Т.о., из 1 кг сухого биопрепарата получают 2000 л рабочей суспензии биопрепарата. Для разложения 1 т нефтепродуктов необходимо 1 кг сухого биопрепарата из серии Ленойл® на одно внесение. При использовании жидкого биопрепарата его предварительно разводят до титра 10^8 КОЕ/мл.

Подготовительные мероприятия технологии применения биопрепарата-нефтедеструктора из серии «Ленойл»® включают в себя: обследование загрязненного объекта и определение его площади; отбор проб с загрязненного объекта и их анализ для определения концентрации загрязнителя, физико-химических свойств грунта, содержания в нем минеральных веществ (азота, фосфора); утверждение вышестоящей организацией проекта рекультивации загрязненного объекта в соответствии с данной технологией и

согласование его с природоохранными органами; определение потребности в минеральных удобрениях; подготовка технических средств для приготовления и внесения удобрений и рабочей суспензии; приготовление рабочей суспензии биопрепарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени накоплен большой научно-практический опыт ликвидации последствий нефтяного загрязнения. Однако учитывая неослабевающую роль углеводородного сырья в мировой экономике и связанную с этим интенсификацию его разведки и добычи, а также разнообразие почвенно-климатических условий, задача разработки и внедрения эффективных способов очистки и восстановления нефтезагрязненных территорий по-прежнему очень актуальна. В настоящем исследовании осуществлено выделение и подробная идентификация микроорганизмов-нефтедеструкторов и бактерии-антагониста фитопатогенных грибов. Изучены их свойства, значимые для экологической биотехнологии и проведены лабораторные и полевые эксперименты, доказывающие эффективность применения этих микроорганизмов для очистки окружающей среды от углеводородного загрязнения в различных климатических условиях. Итогом работы стало описание и таксономическое узаконение нового вида микроорганизмов и разработка серии полифункциональных биопрепаратов под торговой маркой «Ленойл»®, которые снижают содержание углеводородов в рекультивируемых объектах в различных климатических условиях, а также способствуют восстановлению почвы путем фиксации атмосферного азота и стимуляции роста и развития растений-фиторемедиантов. В ходе исследований выполнен целый комплекс научно-практических задач: помимо создания серии биопрепаратов, разработаны и утверждены технические условия и регламенты их промышленного получения; биопрепараты внедрены в производство; разработана технология их применения. Выпуск продукции осуществляет ЗАО НПП «Биомедхим» (г. Уфа). За период с июня 2012 г. произведено 384200 л жидких и 75210 кг сухих препаратов, они успешно используются на территории нашей страны и за рубежом. Полученные в ходе выполнения работы результаты направлены на решение такой важной экологической и хозяйственной проблемы, как очистка окружающей среды от нефти и нефтепродуктов.

ВЫВОДЫ

1. Из нефтезагрязненных почв различных климатических зон России выделен нефтеокисляющий консорциум, состоящий из штаммов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, а также штамм *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T, разлагающий нефть, в т.ч. при низких положительных температурах. Из пахотной почвы изолирован штамм бактерий *P. koreensis* ИБ-4 – антагонист фитопатогенных грибов. Все микроорганизмы идентифицированы согласно требованиям современной систематики прокариот.

2. Описан и таксономически узаконен новый вид микроорганизмов *Pseudomonas turukhanskensis*.

3. Обнаружено, что консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 обладает высокой углеводородокисляющей (43-219 мг CO₂/г субстрата) и нитрогеназной активностью (до 0,44 мкг N₂/мл/ч), а также поверхностно-активными свойствами (снижает поверхностное натяжение на 25 мН/м и эмульгирует гидрофобные субстраты (E₂₄ 55-72%)); штамм *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T окисляет нефть и углеводороды (74-169 мг CO₂/г субстрата при 8°C и 39-155 мг CO₂/г субстрата при 26°C) и способен к азотфиксации (до 0,35 мкг N₂/мл/ч); штамм *P. koreensis* ИБ-4 эффективно фиксирует атмосферный азот (0,65 мкг N₂/мл/ч) и продуцирует фитогормоны цитокининового ряда и ИУК (119 и 40 нг/мл культуральной жидкости соответственно).

4. Установлено, что при внесении консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 в загрязненный нефтью грунт, степень биодegradации нефтепродуктов достигает 75%, а при обработке штаммом *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T нефтезагрязненного песка этот показатель составляет 77-84%.

5. Показано, что использование консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 в резко-континентальном климате Западного Казахстана приводит к снижению концентрации углеводородов в нефтяном шламе с 10,5 до 3,9%, а обработка нефтезагрязненной отбеливающей глины консорциумом микроорганизмов или штаммом *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T в континентальных климатических условиях Южного Урала, с одинаково высокой эффективностью уменьшает в ней содержание поллютанта (с 7,1 до 2,3% и с 22,8 до 10,8%).

6. Выявлено, что применение штамма *P. turukhanskensis* ИБ 1.1^T для очистки почв от нефтяного загрязнения в континентальных климатических условиях Западной Сибири снижало содержание нефтепродуктов с 4,9 до 0,4% за 1 месяц и с 70,3 до 23,3% – за 21 месяц экспозиции.

7. Установлено, что консорциум микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 может быть использован для очистки водной поверхности и производственных сточных вод от нефти и нефтепродуктов. Благодаря его интродукции степень биодеструкции нефти в непроточном болоте составила 97,3%, в сточной воде – 83,2%.

8. Интродукция комбинаций консорциума микроорганизмов *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 с бактериями *P. koreensis* ИБ-4 и *Paenibacillus ehimensis* ИВ 739 снижает содержание нефтепродуктов в почве в 3,1-3,5 раза, ускоряет на 2 суток всхожесть семян и на 6-7 суток начало всех стадий развития растений овса, а также способствует увеличению длины проростков на 34,8-77,8% и их массы в 1,6-2,7 раза по сравнению с растениями в нефтезагрязненной почве, не обработанной микроорганизмами.

9. На основе выделенных и изученных микроорганизмов разработана серия полифункциональных биопрепаратов-нефтедеструкторов под торговой маркой «Ленойл»®,

которая включает в себя биопрепараты «Ленойл»®), СХП (*A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 и *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2), «Ленойл»® – супер, СХП (*A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1, *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2 и *P. koreensis* ИБ-4), «Ленойл»® – гранд, СХП (*A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1, *O. intermedium* ИБ ДТ-5.3/2, *P. koreensis* ИБ-4 и *P. ehimensis* ИВ 739) и «Ленойл»® – NORD, СХП (*P. turukhanskensis* ИБ 1.1^Т), предназначенные для очистки нефтезагрязненных объектов окружающей среды, обезвреживания нефтесодержащих отходов и восстановления почв. Биопрепарат «Ленойл»® – NORD, СХП, помимо прочего, может применяться в условиях низких положительных температур в Западной Сибири.

10. Разработана и утверждена нормативно-техническая документация на производство и разработана технология применения биопрепаратов-нефтеструктуров серии «Ленойл»®.

Рекомендации по использованию результатов работы. Полученные в ходе идентификации микроорганизмов данные по нуклеотидным последовательностям генов, жирным кислотам и клеточным белкам могут быть использованы для установления вида других микроорганизмов. Разработанные биопрепараты-нефтеструктуры серии «Ленойл»® производятся в промышленных масштабах и рекомендуются для очистки в различных климатических условиях почв, грунтов, водных поверхностей, обезвреживания твердых нефтесодержащих отходов и восстановления почв.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Кобызева, Н.В. Использование биопрепарата «Ленойл» для локальной очистки производственных сточных вод, загрязненных углеводородами и их производными / Н.В. Кобызева, **Т.Ю. Коршунова**, Н.Н. Силищев, О.Н. Логинов // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2007. – № 75. – С. 161-163. ИФ 0,373

2. Четвериков, С.П. Биоремедиация замазученного грунта с помощью микробиологических препаратов / С.П. Четвериков, Э.Г. Валиуллин, Э.Р. Гареева, М.Д. Бакаева, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Вестник Башкирского университета. – 2013. – № 3. – С. 723-725. ИФ 0,283

3. **Коршунова, Т.Ю.** Консорциум микроорганизмов, окисляющий нефтяные углеводороды / **Коршунова Т.Ю.**, Мухаматдырова С.Р., Логинов О.Н. // Вестник Башкирского университета. – 2013. – № 3. – С. 734-735. ИФ 0,283

4. **Коршунова, Т.Ю.** Окислительная и нитрогеназная активность бактерии *Ohrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 / **Т.Ю. Коршунова**, С.П. Четвериков, С.Р. Мухаматдырова, О.Н. Логинов // Известия Самарского научного центра РАН. – 2013. – Т. 15, № 3(5). – С. 1637-1640. ИФ 0,240

5. **Коршунова, Т.Ю.** Свойства и филогенетическое положение бактерии *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 / **Т.Ю. Коршунова**, С.Р. Мухаматдырова, О.Н. Логинов // Известия Самарского научного центра РАН. – 2013. – Т. 15, № 3(5). – С. 1645-1648. ИФ 0,240

6. **Коршунова, Т.Ю.** Опыт применения консорциума микроорганизмов-деструкторов углеводов для обезвреживания нефтеотходов / **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 3. – URL: <http://www.science-education.ru/117-13407>. ИФ 0,358
7. **Коршунова, Т.Ю.** Уточнение таксономического статуса бактерии-нефтедеструктора масс-спектрометрическими методами по результатам анализа клеточных белков и исследования состава жирных кислот / **Т.Ю. Коршунова**, С.Р. Мухаматдырова, О.Н. Логинов // Известия РАН. Серия биологическая. – 2015. – № 3. – С. 272-277. Scopus, ИФ 0,893
8. **Коршунова, Т.Ю.** Влияние бактериальных препаратов на содержание нефтепродуктов и численность микроорганизмов в отвалах отработанной отбеливающей глины / **Т.Ю. Коршунова**, С.П. Четвериков, Э.Г. Валиуллин, С.Р. Мухаматдырова, О.Н. Логинов // Экология и промышленность России.– 2016. – Т. 20, № 2. – С. 25-31. Scopus, ИФ 0,423
9. **Коршунова, Т.Ю.** Влияние углеводородокисляющих микроорганизмов на деградацию нефти в песчаном грунте / **Т.Ю. Коршунова**, С.П. Четвериков, Э.Г. Валиуллин, О.Н. Логинов // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2016. – № 1. – С. 45-51. ИФ 0,207
10. **Коршунова, Т.Ю.** Биотехнологический потенциал бактерии *Pseudomonas* sp. ИБ-1.1 как основы полифункционального биопрепарата / **Т.Ю. Коршунова**, С.П. Четвериков, Э.Г. Валиуллин, О.Н. Логинов // Известия ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология. – 2016. – № 1. – С. 93-99. ИФ 0,168
11. **Коршунова, Т.Ю.** Перспективы использования консорциума углеводородокисляющих микроорганизмов для очистки нефтезагрязненной почвы Крайнего Севера / **Т.Ю. Коршунова**, С.П. Четвериков, О.Н. Логинов // Теоретическая и прикладная экология. – 2016. – № 1. – С. 88-94. Scopus, ИФ 0,253
12. Рафикова, Г.Ф. Новый штамм бактерий *Pseudomonas koreensis* ИБ-4 как перспективный агент биологического контроля фитопатогенов / Г.Ф. Рафикова, **Т.Ю. Коршунова**, Л.Ф. Миннебаев, С.П. Четвериков, О.Н. Логинов // Микробиология. – 2016. – Т. 85, № 3. – С. 317-326. WoS, Scopus, ИФ 1,489
13. **Korshunova, T.Y.** *Pseudomonas turukhanskensis* sp. nov., isolated from oil-contaminated soils / T.Y. Korshunova, M.-H. Ramírez-Bahena, S.P. Chetverikov, J.M. Igual, A. Peix, O. Loginov // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2016. – V. 66, № 11. – P. 4657-4664. WoS, Scopus, IF 2,134
14. **Коршунова, Т.Ю.** Молекулярно-генетическая и хемотаксономическая идентификация бактерии рода *Ochrobactrum*, обладающей нефтеокисляющей и

азотфиксирующей активностью / **Т.Ю. Коршунова**, С.Р. Мухаматдырова, О.Н. Логинов // Известия РАН. Серия биологическая. – 2017. – № 5. – С. 507-515. Scopus, ИФ 0,893

15. **Коршунова, Т.Ю.** Токсикологические исследования биопрепарата для деструкции нефти / **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2017. – № 2. – С. 45-49. ИФ 0,207

16. **Коршунова, Т.Ю.** Токсикологическая оценка биопрепаратов-нефтедеструкторов серии «Ленойл»® / **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2017. – № 3. – С. 47-51. ИФ 0,207

17. **Коршунова, Т.Ю.** Токсикологическая оценка биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®-NORD, СХП / **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Токсикологический вестник. – 2017. – № 3 – С. 58-60. ИФ 0,441

18. **Коршунова, Т.Ю.** Полифункциональные биопрепараты-нефтедеструкторы: влияние на растения и содержание нефти в почве / **Т.Ю. Коршунова**, М.Д. Бакаева, О.Н. Логинов // Экология и промышленность России. – 2018. – № 9. – С. 18-22. Scopus, ИФ 0,423

Патенты

19. Патент № 2303061 Российская Федерация. Питательная среда для культивирования бактерий рода *Pseudomonas* / О.Н. Логинов, Н.Н. Силищев, **Т.Ю. Коршунова**, С.П. Четвериков, Е.А. Асабина. Заявитель и патентообладатель ЗАО НПП «Биомедхим». Заявл. 06.09.2005; опубл. 20.07.2007. Бюл. № 20.

20. Патент № 2539148 Российская Федерация. Способ очистки почв от нефти в условиях низких положительных температур психротолерантными бактериями *Pseudomonas* sp. ИБ-1.1 / О.Н. Логинов, С.П. Четвериков, **Т.Ю. Коршунова**, Э.Г. Валиуллин, М.Д. Бакаева, Д.Ф. Фарухшин. Заявитель и патентообладатель ЗАО НПП «Биомедхим» и ФГБУН ИБ УНЦ РАН. Заявл. 20.08.2013; опубл. 10.01.2015. Бюл. № 1.

21. Патент № 2553540 Российская Федерация. Консорциум штаммов микроорганизмов *Acinetobacter* sp. и *Ochrobastrum* sp., используемый для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов / О.Н. Логинов, И.М. Султанов, С.П. Четвериков, Т.К. Давлетшин, **Т.Ю. Коршунова**, Е.А. Столярова, С.Р. Мухаматдырова, Н.В. Кобызева. Заявитель и патентообладатель ЗАО НПП «Биомедхим» и ФГБУН ИБ УНЦ РАН. Заявл. 29.11.2012; опубл. 20.06.2015. Бюл. № 17.

22. Патент № 2627598 Российская Федерация. Способ очистки водных поверхностей от нефтяного загрязнения / **Т.Ю. Коршунова**, С.П. Четвериков, О.Н. Логинов. Заявитель и патентообладатель ЗАО НПП «Биомедхим» и УИБ РАН. Заявл. 29.12.2015; опубл. 09.08.2017. Бюл. № 22.

Статьи, опубликованные в прочих изданиях

23. **Коршунова, Т.Ю.** Микроорганизмы, разлагающие нефтяные углеводороды при пониженной температуре / **Т.Ю. Коршунова**, А.А. Сабиров, С.П. Четвериков, М.Д. Бакаева,

О.Н. Логинов // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2012. – № 3. – С. 76-82. ИФ 0,207

24. **Коршунова, Т.Ю.** Новый штамм бактерии рода *Ochrobactrum*: свойства и филогенетическое положение / **Т.Ю. Коршунова**, С.Р. Мухаматдьярова, О.Н. Логинов // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2013. – № 2. – С. 90-94. ИФ 0,207

25. **Коршунова, Т.Ю.** Окисление бактериями *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 нефти и нефтяных углеводородов / **Т.Ю. Коршунова**, С.Р. Мухаматдьярова, О.Н. Логинов // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2013. – № 3. – С. 16-18. ИФ 0,207

26. **Коршунова, Т.Ю.** Состав жирных кислот клеточной стенки бактерии *Raenibacillus ehimensis* IB-739 / **Т.Ю. Коршунова**, С.Г. Ковальская, А.И. Мелентьев, О.Н. Логинов // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2015. – № 1. – С. 47-52. ИФ 0,207

Избранные тезисы докладов и материалов конференций

27. Кобызева, Н.В. Локальная очистка сточных вод, загрязненных нефтепродуктами, с помощью биопрепарата «Ленойл» / Н.В. Кобызева, **Т.Ю. Коршунова**, Н.Н. Силищев, О.Н. Логинов // Материалы Международной научно-технической конференции «Нефтегазопереработка и нефтехимия-2007» (22 мая 2007 г., Уфа). – Уфа, 2007. – С. 313-314.

28. Сабилов, А.А. Психрофильные микроорганизмы-деструкторы нефтяных углеводородов / А.А. Сабилов, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Сборник научных трудов IV Международной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы науки и техники – 2012» (17-18 мая 2012 г., г. Уфа). – Уфа: Нефтегазовое дело, 2012. – С. 32-33.

29. Сабилов, А.А. Психрофильные микроорганизмы-деструкторы толуола / А.А. Сабилов, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Сборник тезисов Всероссийской молодежной конференции «Актуальные проблемы химии и биологии» (30 июля – 3 августа 2012 г., г. Пущино). – Пущино, 2012. – С. 40-41.

30. **Коршунова, Т.Ю.** Биодеструкция нефтяных углеводородов на примере β -метилнафталина в условиях пониженной температуры / **Т.Ю. Коршунова**, А.А. Сабилов, О.Н. Логинов // Сборник тезисов Всероссийской молодежной конференции «Актуальные проблемы химии и биологии» (30 июля – 3 августа 2012 г., г. Пущино). – Пущино, 2012. – С. 75-76.

31. Сабилов, А.А. Определение нитрогеназной активности штаммов *Pseudomonas* sp. 1.1 и *Ochrobactrum* sp. 1.7 / А.А. Сабилов, С.П. Четвериков, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Материалы VI Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (24-28 сентября 2012 г., г. Саратов). – Саратов: Научная книга, 2012. – С. 87.

32. **Коршунова, Т.Ю.** Скрининг психротолерантных микроорганизмов, деградирующих нефтяные углеводороды / **Т.Ю. Коршунова**, Н.В. Позолотина // Материалы

научно-практической конференции «Государственная политика в области охраны окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» (8-10 октября 2012 г., г. Уфа). – Уфа, 2012. – С. 30-31.

33. Сабилов, А.А. Определение окислительной активности микроорганизмов штамма *Pseudomonas* sp. 1.1 / А.А. Сабилов, С.П. Четвериков, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Сборник тезисов VIII Молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (29-31 октября 2012 г., г. Москва). – М.: МАКС Пресс, 2012. – С. 38-40.

34. **Коршунова, Т.Ю.** Микроорганизмы, деградирующие углеводороды нефти при низких положительных температурах / **Т.Ю. Коршунова**, Н.В., Позолотина, С.П. Четвериков, О.Н. Логинов // Материалы Всероссийской научно-технической конференции «Инновационные технологии в области химии и биотехнологии» (22-23 ноября 2012 г., г. Уфа). – Уфа: УГНТУ, 2012. – С. 70-72.

35. Мухаматдыев, С.Р. Бактерия *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2, разлагающая нефтяные углеводороды / С.Р. Мухаматдыев, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Материалы Всероссийской научно-технической конференции «Инновационные технологии в области химии и биотехнологии» (22-23 ноября 2012 г., г. Уфа). – Уфа: УГНТУ, 2012. – С. 95-96.

36. Мухаматдыев, С.Р. Описание представителя рода *Acinetobacter*, способного к деструкции углеводородов нефти / С.Р. Мухаматдыев, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Сборник трудов V Международной заочной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы науки и техники» (22-24 ноября 2012 г., г. Уфа). – Уфа: Нефтегазовое дело, 2012. – С. 194-195.

37. Мухаматдыев, С.Р. Окисление углеводородов микроорганизмами штамма *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 / С.Р. Мухаматдыев, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Сборник научных трудов II Всероссийской научно-технической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Высокие технологии в современной науке и технике» (ВТСНТ-2013) (27-29 марта 2013 г., г. Томск). – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2013. – Т. 2. – С. 100-101.

38. Мухаматдыев, С.Р. Окисление алифатических углеводородов консорциумом микроорганизмов-нефтедеструкторов / С.Р. Мухаматдыев, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Сборник тезисов IX Молодежной школы конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (21-23 октября 2013 г., г. Москва). – М.: МАКС Пресс, 2013. – С. 39-41.

39. Мухаматдыев, С.Р. Очистка нефтезагрязненной почвы Крайнего Севера с помощью консорциума микроорганизмов / С.Р. Мухаматдыев, **Т.Ю. Коршунова**, С.П. Четвериков // Сборник тезисов школы-конференции молодых ученых на базе Института

фундаментальных проблем биологии РАН «Биосистема: от теории к практике» (24-25 октября 2013 г., г. Пущино). – Пущино, 2013. – С. 92.

40. Мухаматдьярова, С.Р. Перспективы применения консорциума микроорганизмов для деградации нефти и нефтяных фракций / С.Р. Мухаматдьярова, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Сборник докладов III Международной научно-практической конференции с элементами научной школы для молодежи «Экологические проблемы нефтедобычи» (21-23 октября 2013 г., г. Уфа). – Уфа: Нефтегазовое дело, 2013. – С. 6-8.

41. Мухаматдьярова, С.Р. Эмульгирующие свойства штамма *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1, способного к деструкции углеводов нефти / С.Р. Мухаматдьярова, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Сборник материалов VII Всероссийской научной интернет-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии» (11-12 ноября 2013 г., г. Уфа). – Уфа: РИЦ УГНТУ, 2013. – С. 85.

42. Мухаматдьярова, С.Р. Окисление микроорганизмами штамма *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 углеводов парафинового ряда / С.Р. Мухаматдьярова, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Сборник научных трудов VI Международной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы науки и техники – 2013» (22-23 ноября 2013 г., г. Уфа). – Уфа: Нефтегазовое дело, 2013. – С. 52-53.

43. Мухаматдьярова, С.Р. Разложение нефтеотходов бактериями *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 / С.Р. Мухаматдьярова, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Сборник научных трудов по материалам Международной заочной научно-практической конференции «Современные тенденции в образовании и науке» (28 ноября 2014 г., г. Тамбов). – Тамбов: ООО «Консалтинговая компания Юком», 2014. – Ч. 9. – С. 89-90.

44. Мухаматдьярова, С.Р. Эффективность процесса биодеструкции нефтеотходов в полевом эксперименте / С.Р. Мухаматдьярова, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Материалы VIII Всероссийской научной интернет-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии» (24-25 ноября 2014 г., г. Уфа). – Уфа: РИЦ УГНТУ, 2014. – С. 116.

45. Мухаматдьярова, С.Р. Полевой эксперимент по обезвреживанию нефтесодержащих отходов с использованием консорциума углеводородокисляющих микроорганизмов *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 и *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 / С.Р. Мухаматдьярова, **Т.Ю. Коршунова** // Сборник докладов IX Международной конференции аспирантов и студентов «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов». (15-16 апреля 2015 г., г. Донецк). – Донецк: ГВУЗ «ДонТУ», 2015. – С. 245-247.

46. Валиуллин, Э.Г. Деградация нефти в песчаной почве углеводородокисляющими микроорганизмами / Э.Г. Валиуллин, **Т.Ю. Коршунова**, С.П. Четвериков // Материалы VIII Международной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные

проблемы науки и техники – 2015» (16-18 ноября 2015 г., г. Уфа). – Уфа: УГНТУ, 2015. – Т. II. – С. 200-203.

47. Валиуллин, Э.Г. Углеводородоокисляющая активность психротолерантных бактерий *Pseudomonas* sp. ИБ-1.1 / Э.Г. Валиуллин, **Т.Ю. Коршунова**, С.П. Четвериков // Материалы VIII Международной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы науки и техники – 2015» (16-18 ноября 2015 г., г. Уфа). – Уфа: УГНТУ, 2015. – Т. II. – С. 203-206.

48. Мухаматдьярова, С.Р. Состав жирных кислот липидов клеточной стенки микроорганизма *Ochrobastrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 / С.Р. Мухаматдьярова, **Т.Ю. Коршунова**, О.Н. Логинов // Материалы VIII Международной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы науки и техники – 2015» (16-18 ноября 2015 г., г. Уфа). – Уфа: УГНТУ, 2015. – Т. I. – С. 222-225.

49. Валиуллин, Э.Г. Нитрогеназная активность психротолерантных бактерий *Pseudomonas* sp. ИВ-1.1 / Э.Г. Валиуллин, **Т.Ю. Коршунова**, С.П. Четвериков // Материалы IX Всероссийской научной интернет-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии» (24-25 ноября 2015 г., г. Уфа). – Уфа: УГНТУ, 2015. – С. 98-99.

50. **Korshunova, T.Yu.** Effect of polyfunctional bacterial preparations on plant growth and development and oil content in soil / **T.Yu. Korshunova**, M.D. Bakaeva, O.N. Loginov // Материалы Международной научной конференции PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (13-17 июня 2018 г., г. Уфа). – Электронное издание. URL: <http://plamic.ru/sbornik>. – С. 41.

СПИСОК ТЕРМИНОВ И СОКРАЩЕНИЙ

ИУК – индолил-3-уксусная кислота

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ХМАО – Югра – Ханты-мансийский автономный округ – Югра

ЯНАО – Ямало-ненецкий автономный округ

УОМ – углеводородоокисляющие микроорганизмы

МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

СХП – сухая препаративная форма

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ГЦ-пары – гуанин-цитозиновые пары

КОЕ/г – колониеобразующие единицы в 1 грамме

КОЕ/мл – колониеобразующие единицы в 1 миллилитре

E₂₄ – индекс эмульгирования за 24 часа