

## РЕМЕДИАЦИЯ ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ

УДК 579.222

### РАЗРАБОТКА МИКРОБНОГО КОНСОРЦИУМА ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ СРЕДНЕГО ПРИОБЬЯ<sup>1</sup>

© 2022 г. А. А. Ветрова<sup>а</sup>\*, С. Я. Трофимов<sup>б</sup>, Р. Р. Кинжаев<sup>б</sup>, Н. А. Аветов<sup>б</sup>, А. В. Арзамазова<sup>б</sup>,  
И. Ф. Пунтус<sup>а</sup>, О. И. Сазонова<sup>а</sup>, С. Л. Соколов<sup>а</sup>, Р. А. Стрелецкий<sup>б</sup>, К. В. Петриков<sup>а</sup>,  
Я. А. Делеган<sup>а</sup>, В. А. Самойленко<sup>а</sup>, А. Е. Филонов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Федеральный исследовательский центр “Пушчинский научный центр биологических исследований  
Российской академии наук”, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН,  
просп. Науки, Московская обл., Пушкино, 142290 Россия

<sup>б</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: phdvetrova@gmail.com

Поступила в редакцию 01.11.2021 г.

После доработки 22.11.2021 г.

Принята к публикации 30.12.2021 г.

Из нефтезагрязненных образцов почв Среднего Приобья выделены микроорганизмы – деструкторы углеводов, идентифицированные как представители родов *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Kocuria*, *Raoultella* и *Candida*. Проведен их скрининг на способность к деградации различных классов углеводов в широком температурном диапазоне (6–37°C), в кислых средах (до pH 4) и при повышенной засоленности (до 3%), на способность к продукции биоПАВ и на наличие генов, кодирующих ключевые ферменты деградации углеводов. Составлен микробный консорциум в качестве основы биопрепарата для биоремедиации нефтезагрязненных почв Среднего Приобья, включающий штаммы *Candida fluviatilis* 24p-51, *Rhodococcus erythropolis* 24-44, *Acinetobacter calcoaceticus* 7-43 и *Pseudomonas extremaustralis* 7-31. Для данных микроорганизмов были подобраны режимы культивирования и лиофилизации биомассы. В лабораторных модельных системах оценена эффективность деградации углеводов нефти разработанным микробным консорциумом. Степень деградации нефти микробным консорциумом в жидкой минеральной среде составила 56%, в модельном грунте – 22% за 10 сут при 24°C.

**Ключевые слова:** микроорганизмы-нефтедеструкторы, углеводородоокисляющая активность, биопрепарат

**DOI:** 10.31857/S0032180X22050100

#### ВВЕДЕНИЕ

При интенсивной разработке и эксплуатации нефтяных месторождений окружающая природная среда испытывает существенную техногенную нагрузку, часто приводящую к загрязнению и деградации экосистем [17]. Большинство нефтяных месторождений Западной Сибири располагается в географическом районе Среднего Приобья (Ханты-Мансийский автономный округ – Югра) на севере таежной зоны Западной Сибири, отличающейся высокой степенью заболоченности [2, 13]. Данные территории находятся под постоянным негативным воздействием процессов нефтезагрязнения и техногенного засоления почв. Существующие физические, химические и термические методы очистки не позволяют провести

полную рекультивацию нефтезагрязненных территорий. Биоремедиация является экологически безопасной и экономически выгодной технологией для ликвидации и минимизации последствий разливов нефти [35]. Разложение углеводов в почве благодаря метаболической активности микроорганизмов определяется рядом экологических и биологических факторов, варьирующихся от места к месту, таких как pH почвы, температура, доступность кислорода и содержание питательных веществ, рост и выживаемость углеводородоокисляющих микроорганизмов, а также биодоступность углеводов [32]. На сегодняшний день имеется много данных о способности бактерий и грибов, выделенных из различных биотопов, к окислению углеводов нефти [19, 23, 29, 39, 54]. Основными критериями для отбора перспективных углеводородоокисляющих микроорганизмов при разработке микробных консорциумов для очистки окружающей среды от нефти и нефтепродуктов

<sup>1</sup> Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0032180X22050100 для авторизованных пользователей.

являются: способность к деградации разных классов углеводородов, наличие плазмид биодegradации, устойчивость к низким значениям pH и присутствию соли (хлорида натрия), способность к синтезу биологических поверхностно-активных веществ (биоПАВ) и окисление углеводородов в широком температурном диапазоне [3, 25, 36, 43, 49].

Целью данной работы была разработка микробного консорциума, перспективного для очистки нефтезагрязненных территорий Среднего Приобья.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

**Пробоотбор и характеристика образцов.** Отбор образцов осуществлялся на торфяных олиготрофных, мезотрофных и пойменных болотах, а также в заболоченном лесу из профиля оторфованного глеезема. В системе WRB почвы олиготрофных и мезотрофных болот определяются как *Hyperdystric Histosols*, почвы пойменного болота – *Histic Fluvisols*, а оторфованные глееземы – *Histic Gleysols*. Для каждого типа биогеоценоза образцы почв были отобраны на нескольких нефтезагрязненных участках нерекультивированных почв Среднего Приобья (различающихся степенью и возрастом загрязнения, наличием/отсутствием признаков засоления), и их фоновых (чистых) аналогах (подробное описание образцов представлено в статье [14]).

Содержание нефтепродуктов определяли методом ИК-спектromетрии [8]. Интенсивность эмиссии CO<sub>2</sub> оценивали по количеству выделившегося CO<sub>2</sub> из влажных образцов при комнатной температуре, отнесенного к массе сухой почвы [10]. Кислотность почвы определяли согласно ГОСТ 26423–85.

**Среды и условия культивирования микроорганизмов.** В работе использовали полноценную среду Лурия–Бертани [46] и минеральную среду Эванса [26]. Для получения агаризованных сред добавляли 2% (вес./об.) агара (“Difco”, США). Для получения сред с пониженными показателями кислотности pH доводили до значений 5 и 4 концентрированной соляной кислотой, для сред с повышенной засоленностью – вносили 3% (вес./об.) NaCl. Культивирование микроорганизмов в жидкой среде проводили в колбах Эрленмейера объемом 750 мл или пробирках объемом 50 мл при перемешивании на орбитальной качалке (120 об./мин). Температура и время культивирования указаны в описании конкретных экспериментов.

В качестве единственного источника углерода и энергии в жидкую минеральную среду добавляли в количестве 2% (вес./об. для твердых и об./об. для жидких) один из следующих субстратов: сырая нефть, дизельное топливо, нафталин, β-метилнафталин, фенантрен, антрацен, пирен, флуорен,

камфора, бензол, этилбензол, фенол, протокатехонат натрия, салицилат натрия, 4-метилкатехол, нонан, декан, ундекан, додекан, или гексадекан, а гексан и октан вносили в отросток колбы для выращивания в парах. Для агаризованной среды Эванса дизельное топливо вносили в одноразовом пластиковом наконечнике на крышку перевернутой чашки Петри.

**Определение численности микроорганизмов.** Для образцов почвы брали 1 г навески и вносили ее в колбу со 100 мл физиологического раствора, для сухого препарата – 1 г навески вносили в 9 мл физиологического раствора. Пробы перемешивали в течение 30 мин. Далее использовали стандартную методику серийных разведений с высевом до отдельных колоний на агаризованные среды (среда Лурия–Бертани для определения общего количества микроорганизмов; среда Эванса с дизельным топливом для оценки численности нефтедеструкторов). Чашки Петри инкубировали при температуре 24°C в течение 2 сут (среда Лурия–Бертани) и 5 сут (среда Эванса). Высевы проводили в трех повторах.

**Выделение и характеристика углеводородокисляющих микроорганизмов.** Навеску смеси отобранных образцов почвы (общий вес 5 г) помещали в колбу Эрленмейера со 100 мл среды Эванса (pH 5, 3% хлорида натрия, 2% об./об. сырой нефти). Культивирование проводили в течении 10 сут при 24°C и 20 сут при 6°C. Затем делали высевы на агаризованную среду Лурия–Бертани. Морфологически различимые колонии клеток рассеивали до отдельных колоний для получения чистых культур. Выделенные чистые штаммы вторично проверяли на углеводородокисляющую активность по росту в минеральной среде Эванса с нефтью при 24°C в течение 10 сут.

**Таксономическая идентификация наиболее активных штаммов-нефтедеструкторов и поиск генов, ответственных за деградацию углеводородов.** Генотипную ДНК бактерий выделяли с использованием набора *diaGene* (Россия). Выделение плазмидной ДНК проводили методом щелочного лизиса [7].

Идентификацию выделенных микроорганизмов-деструкторов осуществляли определением первичной нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S rРНК (для бактерий) и ITS-региона (для дрожжевых грибов). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли в термоциклере *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, США). Нуклеотидная последовательность, температура отжига праймеров и размер ПЦР продуктов приведены в [11, 12]. Полученные ПЦР-продукты очищали, используя *GeneJET PCR Purification Kit* (Thermo Scientific, США) по протоколу фирмы изготовителя [28].

Определение нуклеотидной последовательности ампликонов проводили на секвенаторе Applied Biosystems 3130 × 1 с использованием набора для секвенирования BigDye v.3.1. Анализ идентичности нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью программы BLASTN [18].

Электрофорез проводили в 0.8–1%-ном горизонтальном агарозном геле и 0.5× трис-боратном буфере [46]. Визуализацию ДНК проводили путем добавления бромистого этидия в агарозу в конечной концентрации 0.5 мкг/мл.

Пульс-электрофорез проводили по протоколу фирмы-производителя (Bio-Rad, США). Приготовление блок-вставок осуществляли согласно [15].

**Определение субстратной специфичности микроорганизмов-деструкторов.** Микроорганизмы культивировали в пробирках с 10 мл среды Эванса с добавлением субстрата при 24°C в течение 10 сут.

**Продукция биологических поверхностно-активных веществ.** Микроорганизмы выращивали на среде Эванса с дизельным топливом при 24°C в течение 5 сут. Культуральную жидкость отстаивали в течение 30 мин в делительных воронках, затем отбирали нижнюю, водную часть пробы, избавляясь таким образом от пленки остаточного субстрата. Измерение проводили методом Дю Нуи (отрыв кольца) на тензиометре К6 (Kruss, ФРГ) при комнатной температуре. Поверхностное натяжение раствора сравнения (минеральная среда Эванса) – 72 мН/м.

**Модельные системы с сырой нефтью.** Эксперименты с жидкой средой проводили в колбах Эрленмейера, содержащих по 100 мл среды Эванса и 2, 10 или 20% (об./об.) сырой нефти. Эксперименты с песком проводили в контейнерах, содержащих по 1 кг промытого и стерилизованного речного песка с 10% (вес./вес.) сырой нефти. Для инокулята брали суспензию микроорганизмов, выращенных на среде Лурия–Бертани, или образец сухого препарата, разведенного в физиологическом растворе. Посевную дозу рассчитывали для достижения итоговой концентрации микроорганизмов  $1 \times 10^7$  КОЕ на мл или г среды. Культивирование проводили в течение 10 сут при 24°C. Колбы помещали на орбитальную качалку (120 об./мин), песок тщательно рыхлили при заеве и через 5 сут. Каждую систему готовили в трех повторах.

**Оценка степени деградации нефти.** Остаточное содержание углеводородов нефти в жидкой среде и песке определяли методом газовой хроматографии после экстракции хлористым метиленом в соответствии с [4]. Для проведения измерений использовали газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором Agilent 6890N (Agilent, США) и капиллярную колонку типа DB-1 (30 м × 0.25 мм × 0.50 мкм). Степень деградации углеводородов оценивали по сравнению с кон-

тролем (модельная система с нефтью без микроорганизмов). Каждое измерение проводили в трех повторностях.

**Культивирование штаммов микробного консорциума.** Работа была выполнена на УНУ “Опытная технологическая установка ИБФМ РАН” (ОТУ ИБФМ РАН), рег. № 279918 на сайте www.ckrf.ru. Инокулят выращивали на среде Лурия–Бертани, объем вносимого инокулята составлял 100 мл. Культивирование выполняли в ферментерах объемом 10 л (АНКУМ), содержащих 7.5 л среды следующего состава (г/л): пептон – 7.0, дрожжевой экстракт – 5.0, хлорид натрия – 1.0, семиводный сульфат марганца – 0.1, семиводный сульфат магния – 0.3, сульфат аммония – 5.0, двенадцативодный гидроортофосфат калия – 2.0, двенадцативодный дигидроортофосфат калия – 0.5, глюкоза – 25.0. Параметры процесса культивирования поддерживали следующими: температура 28°C, pH 7.0, скорость перемешивания 450 об./мин, аэрация 0.5–1.0 л/мин. Продолжительность процесса культивирования микроорганизмов составляла 16–22 ч (до прекращения роста оптической плотности в течение 2–4 ч).

Отделение микробной биомассы проводили на центрифуге К-70 (Janezki, Германия) при скорости вращения ротора 4500 об./мин и температуре 5°C в течение 30 мин.

**Получение сухого препарата.** Полученную биомассу смешивали в соотношении 1 : 1 (вес./об.) с 5% раствором глутамата натрия. Суспензию замораживали при –40°C. Лиофилизацию производили в вакуум-сушильных аппаратах КС-30. Сухой препарат упаковывали в стерилизованные полиэтиленовые пакеты.

**Статистическая обработка результатов.** Обработку результатов осуществляли с помощью встроенного статистического пакета Excel (MS Office 2020).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подробное описание отобранных образцов верхних горизонтов основных типов почв, относящихся к доминирующим типам биогеоценозов Среднего Приобья, представлено в публикации [14]. Почвы были диагностированы как торфяная олиготрофная, торфяная мезотрофная, аллювиальная болотная торфяная и глеезем оторфованный. При этом, хотя аллювиальные и мезотрофные торфяные почвы уступают по площади распространения в регионе олиготрофным, они играют большую роль в поддержании био- и педоразнообразия [1]. В табл. 1 приведены характеристики отобранных образцов почвы. Показатель pH в среднем для всех биотопов составлял 5.2. Наибольшая величина эмиссии углекислого газа была выявлена во всех чистых фоновых образцах, что, вероятно, свидетельствует об активном мета-

**Таблица 1.** Характеристика отобранных образцов почвы

Образец	Содержание нефтепродуктов, %	Доля (%) нефтедеструкторов от общей численности микроорганизмов	pH	Интенсивность эмиссии CO <sub>2</sub> *
P2.1.1**	46.6	2.26	3.9	3
P2.1.2	19.4	12.92	4.0	2
P2.2.1	43.4	7.27	5.0	3
P2.2.2	31.0	2.85	4.1	3
P3	22.7	24.56	6.2	2
P4.1	25.7	27.59	5.5	2
P4.2	34.1	18.82	5.8	2
P5	14.7	13.80	5.1	2
G2.1.1	36.3	4.18	5.2	3
G2.1.2	13.3	30.29	5.1	2
G2.2.1	18.0	16.26	5.7	1
G2.2.2	45.1	40.21	5.5	1
G3	34.7	33.63	5.8	1
L2	19.1	13.74	6.2	2
M1	15.7	2.32	6.2	1
M2	25.9	47.21	4.3	2
П1	32.4	18.37	6.1	3
P1 (фон)	0.9	3.02	4.0	1
G1 (фон)	0.3	15.64	4.3	2
L1 (фон)	1.4	12.33	5.2	1
П1 (фон)	0.1	2.94	5.8	1

\* Величина эмиссии CO<sub>2</sub>: 1 – высокая, 2 – средняя, 3 – низкая (ранжирование выполнено в соответствии с результатами, описанными в [10]).

\*\* Г – торфяная олиготрофная почва (мочажина олиготрофного грядово-мочажинно-сфагнового комплекса), Р – олиготрофное сосново-кустарничково-сфагновое болото, М – торфяная мезотрофная почва (мезотрофное березово-сосновое травяно-моховое болото – мезотрофное болото), П – аллювиальная болотная почва (эвтрофное аллювиальное травяно-осоковое болото), Л – глеезем оторфованный (темнохвойно-мелколиственный лес).

близиме микробного сообщества. В загрязненных образцах торфяной олиготрофной почвы высокая концентрация нефтепродуктов и низкие значения pH отрицательно влияли на количество нефтедеструкторов и интенсивность эмиссии CO<sub>2</sub>. Однако подобный эффект не наблюдался в загрязненных пробах остальных биотопов. Выявлена положительная корреляция между численностью нефтедеструкторов и показателем интенсивности эмиссии углекислого газа.

Трофимовым с соавт. показано, что в исследуемых нефтезагрязненных образцах основной вклад в образование углекислого газа, вероятно, вносят микроорганизмы-деструкторы, использующие соединения нефти в своем метаболизме [14]. Детальное изучение основных физико-химических свойств биотопов и показателей углеводородного состояния почв, а также оценка количества нефтедеструкторов позволили выбрать следующие образцы из трех биотопов: P4.1, G2.2.2, M2. В качестве

критериев отбора использована следующая совокупность свойств: низкое значение pH, содержание углеводов нефти более 25%, высокий показатель интенсивности эмиссии углекислого газа и доля нефтедеструкторов более 20%. Поскольку нефтезагрязненные образцы аллювиальной болотной почвы и глеезема оторфованного были единичными (П1 и Л2), то они также были отобраны для дальнейших экспериментов.

В результате накопительного культивирования смеси образцов почвы при 24°C было выделено 24 штамма, при 6°C – 20. Полученные чистые культуры микроорганизмов были вторично проверены на способность к росту на нефти, что позволило отобрать 14 микроорганизмов-нефтедеструкторов: 24р-61, 24-21, 7р-81, 24р-83, 24-41, 7р-72, 24-44, 7р-51, 7р-62, 7-43, 7-31, 24р-71, 24р-51, 7-41.

По данным ряда исследователей в образцах загрязненных почв с территорий действующих неф-

теперерабатывающих заводов, сельскохозяйственных угодий или промышленных площадок наблюдается доминирование следующих бактериальных родов: *Megamonas*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Aquicella*, *Alicyclobacillus*, *Anaeromyxobacter*, *Bdellovibrio*, *Nitrospira*, *Oscillospira*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Xanthomonas* и *Acinetobacter* [21, 42, 53]. В настоящем исследовании были выделены представители бактерий родов *Pseudomonas* (5 штаммов), *Bacillus* (1 штамм), *Raoutella* (1 штамм), *Acinetobacter* (1 штамм) и *Kocuria* (1 штамм) (табл. 2). Виды рода *Pseudomonas* зачастую являются наиболее распространенными микроорганизмами в нефтезагрязненных почвах, что свидетельствует о значительном вкладе штаммов данного рода в процесс деградации углеводородов [20]. Выявлено, что среди выделенных штаммов кроме бактерий присутствуют 5 представителей дрожжей вида *Candida fluviatilis*. По данным Поляковой [44] отличительной особенностью таксономической структуры микробного сообщества торфов является более высокая встречаемость и разнообразие дрожжей аскомицетового аффинитета родов *Pichia*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia*, *Candida* по сравнению с другими почвами. Можно сделать предположение, что бактерии рода *Pseudomonas* и дрожжи *Candida fluviatilis* являются специфическими микроорганизмами почвенных биотопов Среднего Приобья и могут рассматриваться как важные участники процессов биodeградации.

Для составления наиболее эффективного консорциума необходимо учитывать как особенности климата и почв региона, где планируется проведение ремедиационных мероприятий, так и общие принципы биodeградации, обеспечивающие возможность микробной деструкции субстратов-загрязнителей. На основе этого утверждения были сформулированы конкретные критерии отбора штаммов.

По данным авторов [14], для различных биотопов Среднего Приобья характерны засоленные почвы с низкими значениями pH. Кроме того, средняя температура летом в данном регионе варьирует от 7 до 35°C. Анализ результатов экспериментов по оценке способности микроорганизмов к деградации нефти в температурном диапазоне от 6 до 37°C при низких значениях pH и в присутствии хлорида натрия выявил штаммы, обладающие наиболее активным ростом в перечисленных условиях: штаммы *Candida fluviatilis* 24-21, 24p-51, 24p-71, 24p-83; *Acinetobacter calcoaceticus* 7-43; *Rhodococcus erythropolis* 24-44 и *Pseudomonas extremaustralis* 7-31 (табл. S1, S2). Следует отметить, что доминирующими в этих исследованиях были дрожжи вида *Candida fluviatilis*. Как известно, дрожжевые грибы зачастую преобладают в средах с высокой засоленностью и повышенной кислотностью.

Алифатические, разветвленные и циклоалифатические алканы, а также различные моно- и полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) являются наиболее распространенными углеводородами, входящими в состав нефти и продуктов ее переработки. Несмотря на то, что почвенные микроорганизмы утилизируют широкий класс субстратов, для биоремедиации территорий, загрязненных таким сложным комплексом углеводородов, необходимо все же совместное участие микроорганизмов, обладающих различными генетическими системами катаболизма углеводородов. В табл. 2 представлены результаты анализа штаммов на способность к росту на различных углеводородных субстратах. Выявлено, что псевдомонады 7p-81, 7-41, 7-31 и 7p-62 способны деградировать как алифатические, так и ароматические углеводороды. Дрожжи *Candida fluviatilis* и бактерия *Rhodococcus erythropolis* 24-44 обладали наиболее активным ростом в минеральной среде с n-алканами.

Знание метаболических путей и генов, участвующих в деградации углеводородов, помогает в оптимизации подходов к биоремедиации, поэтому наличие генов деградации n-алканов и ароматических углеводородов в исследуемых штаммах определяли методом ПЦР с праймерами к последовательностям известных катаболических генов.

Исследуемые штаммы были протестированы методом ПЦР на наличие гена *alkB*, кодирующего алкан гидроксилазу, с праймерами позволяющими амплифицировать фрагмент данного гена у таких филогенетически удаленных родов, как *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Amycolicococcus*, *Nocardioides*, *Prauserella*, *Micromonospora*, *Frankia*, *Alcanivorax* и др. [50]. Ген *alkB* может служить маркером для определения биоремедиационного потенциала территорий, загрязненных нефтью [50]. Специфичная амплификация гена *alkB* наблюдалась у четырех исследованных в работе штаммов: *P. extremaustralis* 7-31, *P. fluorescens* 7-41, *P. veronii* 7p-62 и *P. fluorescens* 7p-81 (табл. S3). *Rhodococcus erythropolis* 24-44 способен к росту на алканах с длиной цепи от C<sub>9</sub>, однако в данном штамме не был обнаружен ген *alkB*, кодирующий алкан гидроксилазу. Следует отметить, что способность к деградации алканов у штаммов *Rhodococcus* sp. может быть обусловлена наличием CYP-генов, также ответственных за деградацию алканов [40]. Вероятно, в штамме *Rhodococcus erythropolis* 24-44 за окисление алканов отвечают CYP гены.

Начальной стадией деградации ПАУ у большинства микроорганизмов является включение атома кислорода в ароматическое кольцо при участии гидроксилирующей диоксигеназы. Гены *phnAc* и *nahAc*, кодирующие большие субъединицы фенантрен 3,4- и нафталин 1,2-, диоксигеназ, соответственно, считаются хорошими

Таблица 2. Критерии отбора штаммов в консорциум

Наименование штамма	Видовая принадлежность	Рост							Наличие плазмид	Синтез биоПАВ	Итоговый ранг
		н-алканы	МАУ*	ПАУ	в широком температурном диапазоне	в кислых средах	в засоленных средах				
24p-51	<i>Candida fluvialtilis</i>	++	-	+	++	++	++	++	-	-	4
7-43	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	++	++	+	+	+	++	++	-	-	4
7-31	<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	++	+	+	+	++	+	+	+	-	4
24-44	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	+	+	-	+	++	++	++	-	+	3
7p-81	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	++	++	++	-	-	+	+	+	-	3
7-41	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	++	-	+	+	+	++	++	+	-	3
24-21	<i>Candida fluvialtilis</i>	-	+	-	++	++	++	++	-	-	2
24p-71	<i>Candida fluvialtilis</i>	+	-	-	++	++	++	++	-	-	2
24p-83	<i>Candida fluvialtilis</i>	+	+	-	++	++	++	++	-	-	2
7p-62	<i>Pseudomonas veronii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	2
24p-61	<i>Kocuria rosea</i>	+	++	-	-	-	+	+	-	-	1
24-41	<i>Raoultella planticola</i>	++	-	-	+	+	+	-	-	-	1
7p-72	<i>Candida fluvialtilis</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	1
7p-51	<i>Pseudomonas putida</i>	+	+	++	-	-	-	-	+	-	1

\* МАУ – моноциклический ароматический углеводород, ПАУ – полициклический ароматический углеводород, биоПАВ – биологическое поверхностно-активное вещество.

Примечание. Для этих категорий, а также для способности к росту в разных условиях каждому штамму присваивали один из трех уровней: низкий, умеренный и высокий (обозначения в табл. 2: “-”, “+”, “++” соответственно). Для двух категорий, синтез биоПАВ и наличие плазмид, ввели два уровня: наличие или отсутствие соответствующего свойства (обозначения в табл. 2: “-”, “+” соответственно). Итоговый ранг присваивался штаммам на основе обобщенной оценки их уровня по всем критериям. Всего было выделено 4 ранга (обозначения в табл. 2: “1-4”, где “4” – наилучшее соответствие всем критериям). Самый низкий ранг “1”, соответствующий микроорганизмам, плохо подходящим для включения в консорциум, был присвоен четырем штаммам, следующий ранг “2” – также четырем штаммам.

**Таблица 3.** Данные субстратной специфичности наиболее перспективных микроорганизмов-деструкторов

Штаммы	Дизельное топливо	Нафталин	β-Метилнафталин	Фенантрен	Антрацен	Пирен	Флуорен	Камфора	Бензол	Этилбензол	Фенол	4-Метилкатехол	Протокатехоат	Гексан	Октан	Нонан	Декан	Ундекан	Додекан	Гексадекан	Салицилат	
24-21	3*							1				3	0.5								3	
24p-51	3	2	1	3													3	3	3	3	0.5	
24p-71	3	1		1						0.5									3	1		
24p-83	3								2								2	2	2	2	0.5	
24p-61	3			0.5					2	1	2			2	1	2	2			1		
24-44	3																3	3	3	3		
24-41	2								2	2						2		2				
7p-72	2														0.5				2	2		
7-43	3	2					0.5					2	3		3	0.5			3	3	0.5	
7-41	1	3	3					0.5							3	0.5	2	0.5	3	3	0.5	
7p-62	1	3	3									1	2			3	2	1			0.5	
7-31	3	2	2										3	2		2	2	2	3	3	0.5	
7p-51	2	1	1	3	1	1	0.5				0.5					1	0.5	0.5	1	1	3	
7p-81	0.5	3	3	0.5	0.5	0.5	0.5		0.5		0.5	2		2		0.5	3	2	3	1	0.5	

\* 3 – максимальный показатель роста на субстрате, 2 – средний показатель роста на субстрате, 1 – рост на субстрате, 0.5 – слабый рост на субстрате.

маркерами для оценки биодegradационного потенциала микрофлоры загрязненных нефтью и нефтепродуктами почв [34, 52]. Ни в одном из исследуемых образцов не наблюдалось специфичной амплификации гена *phnAc*. При амплификации гена большой субъединицы нафталин 1,2-диоксигеназы ПЦР-продукты соответствующего размера были получены только в случае псевдомонад: 7-31, 7-41, 7p-51, 7p-62 и 7p-81.

Штаммы *P. putida* 7p-51 и *P. fluorescens* 7p-81 способны к росту как на нафталине, так и на фенантрине в качестве единственного источника углерода и энергии. Однако по результатам ПЦР-анализа в данных штаммах присутствует только последовательность гена большой субъединицы нафталин 1,2-диоксигеназы. Известно, что нафталин 1,2-диоксигеназа обладает широкой субстратной специфичностью и может участвовать в окислении более высокомолекулярных ПАУ, таких как фенантрен, антрацен и бифенил [31, 47]. Вероятно, в этих штаммах расщепление кольца фенантрена также происходит при участии нафталин 1,2-диоксигеназы.

Салицилат служит ключевым интермедиатом в путях катаболизма многих ароматических углеводородов [22, 24, 27, 33]. Для изучения генетического контроля деградации салицилата у исследу-

емых штаммов проводили ПЦР-анализ на присутствие следующих катаболические гены: *nahG*, *nahH* и *nagG*, которые кодируют салицилат 1-гидроксилазу, катехол 2,3-диоксигеназу и большую субъединицу оксигеназного компонента салицилат 5-гидроксилазы соответственно. При амплификации гена *nagG* ПЦР-продуктов не было получено ни с одним из исследуемых образцов. Последовательности генов салицилат 1-гидроксилазы, *nahG*, а также гена катехол 2,3-диоксигеназы, *nahH*, были обнаружены только у штаммов рода *Pseudomonas*: 7-31, 7-41, 7p-51, 7p-62 и 7p-81.

Пять штаммов псевдомонад – *P. extremaustralis* 7-31, *P. fluorescens* 7-41, *P. putida* 7p-51, *P. veronii* 7p-62 и *P. fluorescens* 7p-81 – одновременно содержат последовательности генов *nahAc*, *nahG*, а также гена *nahH*, что свидетельствует о присутствии в данных штаммах “классических” оперонов катаболизма нафталина [5].

Известно, что гены, ответственные за катаболизм различных ксенобиотиков, могут иметь как хромосомную локализацию, так и располагаться на конъюгативных плаزمидах большого размера [30, 45]. Для детекции плазмидной ДНК в исследуемых штаммах использовали два подхода: щелочной лизис и пульс-электрофорез в агарозных блок-вставках. Комбинация этих двух методов поз-

воляет достоверно определить наличие в штамме плазмид даже относительно большого размера (более 200 т. п. н.). У пяти штаммов, относящихся к роду *Pseudomonas* (*P. extremaustralis* 7-31, *P. fluorescens* 7-41, *P. putida* 7p-51, *P. veronii* 7p-62 и *P. fluorescens* 7p-81), были обнаружены плазмидные ДНК размером более 180 т. п. н. Так как ни одним из двух вышеперечисленных подходов не удалось обнаружить плазмидные ДНК у оставшихся девяти штаммов, то можно с уверенностью утверждать об отсутствии плазмид в следующих штаммах: *Candida fluviatilis* 24-21, *Raoutella planticola* 24-41, *Candida fluviatilis* 24p-51, *Kocuria rosea* 24p-61, *Candida fluviatilis* 24p-71, *Candida fluviatilis* 24p-83, *Acinetobacter calcoaceticus* 7-43, *Candida fluviatilis* 7p-72, *Rhodococcus erythropolis* 24-44. Наличие гена *nahH* является косвенным свидетельством плазмидной локализации катаболических оперонов [48], весьма вероятно, что у исследуемых штаммов псевдомонад гены биодegradации нафталина также расположены на плазмидах.

Микроорганизмы обладают различными механизмами для обеспечения эффективного потребления углеводородных субстратов, например, такими как образование поверхностно-активных веществ [35]. БиоПАВ являются амфифильными соединениями, способными значительно снижать поверхностное и межфазное натяжение. Способность к продукции таких соединений широко распространена среди нефтеокисляющих микроорганизмов [16, 38]. Наличие в ростовой среде биоПАВ обеспечивает эмульгирование нерастворимых в воде субстратов, к которым относятся углеводороды [37]. Такой механизм, как предполагается, способствует увеличению биодоступности субстрата для клеток, что облегчает его использования в качестве источника углерода и энергии, а, следовательно, позволяет повысить эффективность биодegradации в целом [41]. В качестве важнейшего критерия отбора продуцентов биоПАВ рассматривается уменьшение поверхностного натяжения культуральной среды не менее чем до 40 мН/м [51]. Среди исследуемых микроорганизмов, только для одного штамма, *Rhodococcus erythropolis* 24-44, было отмечено существенное снижение поверхностного натяжения (до  $30 \pm 1$  мН/м) (табл. S4), что свидетельствует о его способности к продукции эффективных биоПАВ.

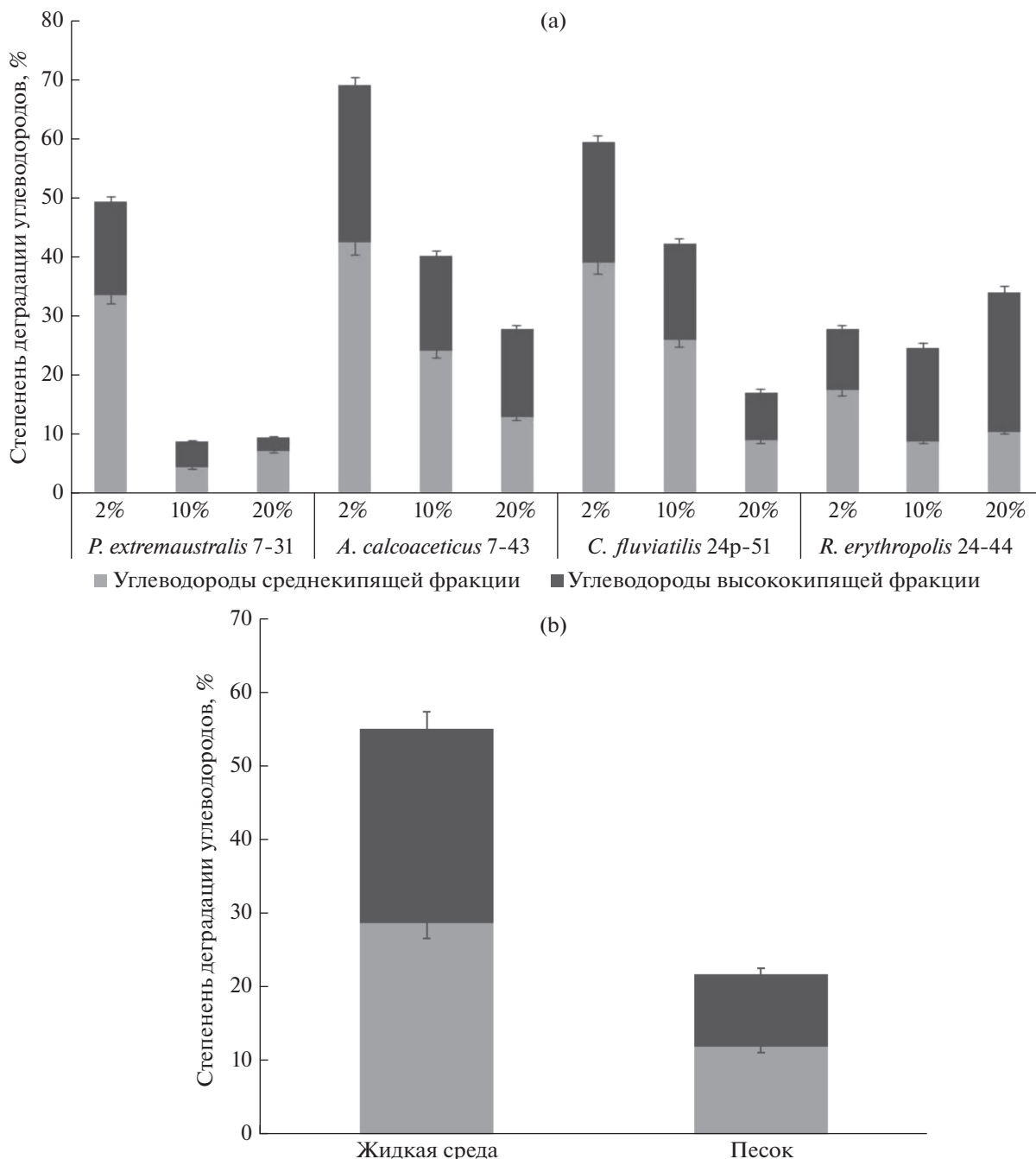
Таким образом, были сформулированы следующие критерии, по которым производился отбор наиболее эффективных штаммов в итоговый консорциум: наличие широкого спектра окисляемых субстратов различных классов; способность к росту на углеводородах в широком температурном диапазоне; способность к росту на углеводородах в кислых средах; способность к росту на углеводородах при повышенном содержании соли; наличие плазмид; способность к продукции биоПАВ.

Спектр окисляемых субстратов оценивали отдельно для трех классов соединений: алканы, МАУ (моноциклические ароматические углеводороды) и ПАУ. Наиболее перспективными для включения в состав консорциума являлись штаммы, получившие высокие ранги “3” и “4”: *Candida fluviatilis* 24p-51, *Rhodococcus erythropolis* 24-44, *Acinetobacter calcoaceticus* 7-43, *Pseudomonas fluorescens* 7-41, *Pseudomonas extremaustralis* 7-31 и *Pseudomonas fluorescens* 7p-81. В процессе выполнения экспериментов была выявлена плохая осаждаемость клеток штамма 7p-81, что очень затрудняет получение биомассы для препарата. Кроме того, для меньшей конкуренции в метаболизме штаммов целесообразно включать микроорганизмы разных родов, поэтому в состав консорциума вошли штаммы *Candida fluviatilis* 24p-51, *Rhodococcus erythropolis* 24-44, *Acinetobacter calcoaceticus* 7-43 и *Pseudomonas extremaustralis* 7-31.

Отобранные штаммы были проанализированы в отношении эффективности деградации различных фракций нефти. Наблюдалось постепенное снижение деградационной активности штаммов *Acinetobacter calcoaceticus* 7-43 и *Candida fluviatilis* 24p-51 с увеличением уровня исходной концентрации нефти (рис. 1а). Деградационная активность штамма *Pseudomonas extremaustralis* 7-31 резко, в 5 раз, уменьшалась с увеличением количества нефти в среде с 2 до 10%. Деградация нефти штаммом *Rhodococcus erythropolis* 24-44 практически не изменялась с увеличением концентрации нефти в среде, однако менялось соотношение убыли углеводородов разных фракций: при высоких концентрациях штамм обладал большей активностью в отношении углеводородов высококипящей фракции нефти.

В модельных системах с 2% нефти была проведена качественная и количественная оценка остаточного содержания ПАУ (табл. S5). В системе со штаммом 24p-51 выявили наибольшее снижение концентрации нафталина и дибенз(а, h)антрацена. Штамм 7-31 активно потреблял нафталин, флуорантен, дибенз(а, h)антрацен и бензо(g,h,i)перилен. Для штамма 7-43 обнаружили наибольшее уменьшение количества нафталина, антрацена, флуорантена, бенз(а)антрацена, бенз(а)пирена и дибенз(а, h)антрацена. Для системы со штаммом 24-44 не выявлено значительного изменения концентрации ПАУ, в то же время родококк значительно деградировал n-алканы как среднекипящей, так и высококипящей фракций углеводородов нефти (табл. S6). Исходя из суммарных значений остаточных концентраций ПАУ (табл. S5), наибольшая общая деградация ПАУ выявлена в модельных системах со штаммом 7-31 по сравнению с контролем без микроорганизмов. Следует отметить, что к среднекипящей фракции углеводородов нефти относятся нафталин, аценафтен, флуорен, фенантрен и антрацен. Причем полученные результаты соотносятся с наличием генов





**Рис. 1.** Степень деградации углеводородов разных фракций в жидкой минеральной среде с разным содержанием нефти (а) и в жидкой минеральной среде и песке с 10% нефти (б) относительно контрольных систем без микроорганизмов за 10 сут при температуре 24°C. Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение для трех биологических повторов.

деградации ПАУ, обнаруженных у штамма *Pseudomonas extremaustralis* 7-31, что, вероятно, и обусловило наибольшую убыль ароматических углеводородов.

Основой большинства биопрепаратов для очистки территорий и акваторий от нефтяных загрязнений являются живые клетки микроорганизмов, сохранившие высокую активность

ферментных систем биodeградации компонентов нефти. Получение биомассы жизнеспособных бактерий (культивирование) является основным этапом получения биопрепарата. От качества полученного биоматериала зависит и эффективность биоремедиации. В то же время стадия культивирования микроорганизмов — одна из самых затратных: расходы на питательные

Таблица 4. Культивирование штаммов консорциума и получение сухих препаратов

Штамм	Время роста, ч	Вес концентрированной биомассы, г	Численность микроорганизмов, КОЕ/мл в концентрированной биомассе	Вес сухого препарата, г	Численность микроорганизмов, КОЕ/г сухого препарата
<i>Candida fluviatilis</i> 24p-51	20	140	$2.2 \times 10^{10}$	82	$1.8 \times 10^9$
<i>Rhodococcus erythropolis</i> 24-44	22	150	$1.9 \times 10^{10}$	98	$1.1 \times 10^{11}$
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 7-43	18	160	$2.0 \times 10^{10}$	71	$1.6 \times 10^{10}$
<i>Pseudomonas extremaustralis</i> 7-31	16	110	$5.2 \times 10^9$	88	$2.5 \times 10^9$

среды, электроэнергию для биореакторов и т. д. составляют большую часть себестоимости готового биопрепарата. Поэтому на заключительном этапе работы проводили отработку режимов культивирования штаммов микробного консорциума. В табл. 4 представлены результаты по разделному глубинному культивированию штаммов микробного консорциума. Длительность процесса составляла от 16 до 22 ч. Численность микроорганизмов в концентрированных суспензиях составляла более  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл, что свидетельствует о сбалансированности химического состава питательных сред и оптимально подобранных условиях культивирования штаммов. Куюкиной с соавт. [6] было продемонстрировано совместное культивирование микроорганизмов одного рода. Однако подобный подход невозможно было использовать в нашей работе, так как условия для оптимального роста бактерий и дрожжей микробного препарата значительно различались.

Одним из критических параметров, определяющих качество бактериальных препаратов, используемых в различных отраслях, является сохранение числа жизнеспособных клеток (КОЕ) в процессе высушивания. Важнейшую роль для успешного решения задачи стабилизации КОЕ является выбор оптимальной композиции защитных сред (криопротекторов). В составе защитных сред основную роль играют две группы веществ: углеводно-белковые структуры, определяющие кристаллическую структуру при замораживании продуктов, и группа антиоксидантов. В качестве антиоксиданта использовали глутамат натрия в количестве 5%, продемонстрировавшего высокую эффективность в работе [9]. Численность жизнеспособных микроорганизмов в полученных сухих препаратах варьировала от  $10^9$  до  $10^{11}$ .

На основе полученных результатов был приготовлен сухой препарат, включающий штаммы, входящие в состав консорциума. Численность в концентрате составила –  $1.5 \times 10^{10}$  КОЕ/г

сухого препарата. Через 1 мес. хранения сухого препарата консорциума при температуре  $6^\circ\text{C}$  численность микроорганизмов сократилась в 1.2 раза, что свидетельствует о высокой эффективности хранения биомассы микроорганизмов-нефтедеструкторов.

Для оценки качества полученного сухого препарата микробного консорциума были проведены модельные лабораторные эксперименты. Результаты анализа (рис. 1b) продемонстрировали более равномерное потребление углеводов разных фракций нефти, как в жидкой минеральной среде, так и в песке, по сравнению с рис. 1a (уровень загрязнения 10%). Убыль нефти в жидкой минеральной среде составила 56%, что превышало показатели, полученные для отдельных микроорганизмов (рис. 1a). Деградация нефти микробным консорциумом в жидкой среде происходила в 2 раза быстрее по сравнению с песком. Вероятно, при активном перемешивании жидкой минеральной среды увеличивались доступ кислорода и равномерность распределения углеводов в системе, что способствовало ускоренному потреблению углеводов микроорганизмами консорциума. Для обеспечения эффективности деградации углеводов нефти микробным консорциумом в почвенных системах необходима периодическая вспашка почвы и увеличение срока рекультивации.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании анализа физиолого-биохимических и генетических свойств выделенных и идентифицированных штаммов-деструкторов углеводов нефти составлен алгоритм разработки микробного консорциума для очистки нефтезагрязненных территорий Среднего Приобья. В состав микробного консорциума вошли следующие штаммы – *Candida fluviatilis* 24p-51, *Rhodococcus erythropolis* 24-44, *Acinetobacter calcoaceticus* 7-43 и *Pseudomonas extremaustralis* 7-31.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена частично в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 121041300098-7, частично в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ им. М.В. Ломоносова “Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды”.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Таблица S1. Способность микроорганизмов деградировать нефть в температурном диапазоне 6–37°C и значении pH 4–5.

Таблица S2. Способность микроорганизмов деградировать нефть при температуре 24°C и 3%-ном хлориде натрия.

Таблица S3. Результаты ПЦР-анализа ключевых генов катаболизма алифатических и ароматических углеводов и размер обнаруженных плазмид.

Таблица S4. Поверхностное натяжение культуральной среды при выращивании микроорганизмов на различных субстратах.

Таблица S5. Остаточное содержание полициклических ароматических углеводов в модельных системах с минеральной средой и 2% сырой нефти.

Таблица S6. Остаточное содержание алканов в модельных системах с минеральной средой и 2% сырой нефти.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аветов Н.А., Кузнецов О.Л., Шишконова Е.А. Почвы олиго-мезотрофных и мезотрофных болот бореального пояса Западной Сибири: возможность геоботанической диагностики в рамках типа торфяных мезотрофных почв // Почвоведение. 2021. № 5. С. 568–581.  
<https://doi.org/10.31857/S0032180X21030023>
2. Аветов Н.А., Шишконова Е.А. Загрязнение нефтью почв таежной зоны Западной Сибири // Бюл. Почв. ин-та им. В.В. Докучаева. 2011. № 68. С. 45–55.
3. Ветрова А.А., Иванова А.А., Филонов А.Е., Забелин В.А., Гафаров А.Б., Соколов С.Л., Нечаева И.А., Пунтус И.Ф., Боронин А.М. Биодеструкция нефти отдельными штаммами и принципы составления микробных консорциумов для очистки окружающей среды от углеводов нефти // Известия Тульского гос. ун-та. Естественные науки. 2013. № 2. С. 241–257.
4. Другов Ю.С., Родин А.А. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов: практическое руководство. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. 270 с.
5. Измалкова Т.Ю., Сазонова О.И., Соколов С.Л., Кошелева И.А., Боронин А.М. Плазмиды биодеградации нафталина и салицилата P-7 группы несовместимости в штаммах флуоресцирующих псевдомонад // Микробиология. 2005. № 3(74). С. 342–348.
6. Куюкина М.С., Ившина И.Б. Пат. РФ № 2180276 // Бюл. изобр. 2002. № 7.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
8. Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в минеральных, органогенных, органо-минеральных почвах и донных отложениях методом ИК-спектроскопии: ПНД Ф 16.1:2.2.22-98. М., 1998.
9. Петриков К.В. Биологические поверхностно-активные вещества, продуцируемые микроорганизмами-нефтедеструкторами родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*. 2011. 136 с.
10. Практикум по почвоведению / Под ред. Н.Ф. Ганжары. М.: Агроконсалт, 2002. 280 с.
11. Сазонова О.И., Ветрова А.А., Гафаров А.Б., Соколов С.Л. Выделение эпифитных штаммов *Aureobasidium pullulans*, продуцирующих высокомолекулярные внеклеточные полисахариды. // Известия Тульского гос. ун-та. Естественные науки. 2017. № 4. С. 24–31.
12. Сазонова О.И., Ветрова А.А., Стрелецкий Р.А., Гафаров А.Б., Кошелева И.А., Филонов А.Е., Соколов С.Л. Штаммы *Pseudomonas extremaustralis* 7–31 и *Pseudomonas fluorescens* 7–41, деградирующие алифатические и ароматические углеводороды // Известия Тульского гос. ун-та. Естественные науки. 2019. № 3. С. 31–43.
13. Середина В.П., Колесникова Е.В., Кондыков В.А., Непотребный А.И., Огнев С.А. Особенности влияния нефтяного загрязнения на почвы средней тайги Западной Сибири // Нефтяное хозяйство. 2017. № 5. С. 108–112.
14. Трофимов С.Я., Арзамасова А.В., Кинжаев Р.Р., Аветов Н.А., Карпунин М.М. Минерализация органического вещества нефтезагрязненных и фоновых почв Среднего Приобья в лабораторных условиях // Вестник Моск. ун-та. Сер. 17. Почвоведение. 2021. № 2. С. 51–56.
15. Alonso R., Martín A., Peláez T., Marín M., Rodríguez-Creixéms M., Bouza E. An improved protocol for pulsed-field gel electrophoresis typing of *Clostridium difficile* // J. Medical Microbiology. 2005. V. 2(54). P. 155–157.  
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.45808-0>
16. Antoniou E., Fodelianakis S., Korkakaki E., Kalogerakis N. Biosurfactant production from marine hydrocarbon-degrading consortia and pure bacterial strains using crude oil as carbon source // Frontiers in Microbiology. 2015. V. 06.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00274>
17. Barron M.G., Vivian D.N., Heintz R.A., Yim U.H. Long-term ecological impacts from oil spills: Comparison of Exxon Valdez, Hebei Spirit, and Deepwater Horizon // Environmental Science & Technology. 2020. V. 11(54). P. 6456–6467.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.9b05020>

18. BLAST: B. L. A. S. T.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>
19. Brooijmans R.J.W., Pastink M.I., Siezen R.J. Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew // *Microbial Biotechnology*. 2009. V. 6(2). P. 587–594.  
<https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00151.x>
20. Cabral L., Giovanella P., Pellizzer E.P., Teramoto E.H., Kiang C.H., Sette L.D. Microbial communities in petroleum-contaminated sites: Structure and metabolisms // *Chemosphere*. 2022. V. 2(286). P. 131752.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131752>
21. Dasgupta A., Saikia R., Handique P.J. Mapping the bacterial community in Digboi oil refinery, India by high-throughput sequencing approach // *Current Microbiology*. 2018. V. 11(75). P. 1441–1446.  
<https://doi.org/10.1007/s00284-018-1541-x>
22. Davies J., Evans W. Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads. The ring-fission mechanism // *Biochemical J*. 1964. V. 2(91). P. 251–261.  
<https://doi.org/10.1042/bj0910251>
23. Derguine-Mecheri L., Kebbouche-Gana S., Djenane D. Biosurfactant production from newly isolated *Rhodotorula* sp. YBR and its great potential in enhanced removal of hydrocarbons from contaminated soils // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2021. V. 1(37). P. 18.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-020-02983-3>
24. Doddamani H.P., Ninnekar H.Z. Biodegradation of carbaryl by a *Micrococcus* species // *Current Microbiology*. 2001. V. 1(43). P. 69–73.  
<https://doi.org/10.1007/s002840010262>
25. Elumalai P., Parthipan P., Huang M., Muthukumar B., Cheng L., Govarthanam M., Rajasekar A. Enhanced biodegradation of hydrophobic organic pollutants by the bacterial consortium: Impact of enzymes and biosurfactants // *Environmental Pollution*. 2021. V. 289. P. 117956.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117956>
26. Evans C.G.T., Herbert D., Tempest D.W. The continuous cultivation of microorganisms: 2. Construction of a chemostat // *Methods in Microbiology*. 1970. V. 2. P. 277–327.
27. Evans W., Fernley H., Griffiths E. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil pseudomonads. The ring-fission mechanism // *Biochemical J*. 1965. V. 3(95). P. 819–831.  
<https://doi.org/10.1042/bj0950819>
28. GeneJET PCR Purification Kit [Электронный ресурс]. URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0702>
29. Germida J.J., Frick C.M., Farrell R.E. Phytoremediation of oil-contaminated soils // *Developments in Soil Science*. 2002. V. 28. P. 169–186.  
[https://doi.org/10.1016/S0166-2481\(02\)80015-0](https://doi.org/10.1016/S0166-2481(02)80015-0)
30. Herrick J.B., Stuart-Keil K.G., Ghiorse W.C., Madsen E.L. Natural horizontal transfer of a naphthalene dioxygenase gene between bacteria native to a coal tar-contaminated field site // *Applied and Environmental Microbiology*. 1997. V. 6(63). P. 2330–2337.  
<https://doi.org/10.1128/aem.63.6.2330-2337.1997>
31. Kiyohara H., Torigoe S., Kaida N., Asaki T., Iida T., Hayashi H., Takizawa N. Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, pah, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82 // *J. Bacteriology*. 1994. V. 8(176). P. 2439–2443.  
<https://doi.org/10.1128/jb.176.8.2439-2443.1994>
32. Koshlaf E., Ball A. Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments // *AIMS Microbiology*. 2017. V. 1(3). P. 25–49.  
<https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.1.25>
33. Larkin M.J., Day M.J. The metabolism of carbaryl by three bacterial isolates, *Pseudomonas* spp. (NCIB 12042 & 12043) and *Rhodococcus* sp. (NCIB 12038) from garden soil // *J. Applied Bacteriology*. 1986. V. 3(60). P. 233–242.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1986.tb01078.x>
34. Laurie A.D., Lloyd-Jones G. Quantification of *phnAc* and *nahAc* in contaminated New Zealand soils by competitive PCR // *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. V. 5(66). P. 1814–1817.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.1814-1817.2000>
35. Ławniczak Ł., Woźniak-Karczewska M., Loibner A.P., Heipieper H.J., Chrzanowski Ł. Microbial degradation of hydrocarbons – basic principles for bioremediation: A review // *Molecules*. 2020. V. 4(25). P. 856.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25040856>
36. Li X., Zhao L., Adam M. Biodegradation of marine crude oil pollution using a salt-tolerant bacterial consortium isolated from Bohai Bay, China // *Marine Pollution Bulletin*. 2016. V. 1(105). P. 43–50.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.073>
37. Markande A.R., Patel D., Varjani S. A review on biosurfactants: properties, applications and current developments // *Bioresource Technology*. 2021. V. 330. P. 124963.
38. Mehetre G.T., Dastager S.G., Dharme M.S. Biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by pure and mixed cultures of biosurfactant producing thermophilic and thermo-tolerant bacteria // *Science of the Total Environment*. 2019. V. 679. P. 52–60.
39. Mnif S., Chamkha M., Sayadi S. Isolation and characterization of *Halomonas* sp. strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hypersaline conditions // *J. Applied Microbiology*. 2009. V. 3(107). P. 785–794.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04251.x>
40. Nie Y., Chi C.-Q., Fang H., Liang J.-L., Lu S.-L., Lai G.-L., Tang Y.-Q., Wu X.-L. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments // *Scientific Reports*. 2014. V. 1(4). P. 4968.
41. Patel S., Homaei A., Patil S., Daverey A. Microbial biosurfactants for oil spill remediation: pitfalls and potentials // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019. V. 1(103). P. 27–37.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9434-2>
42. Patel V., Sharma A., Lal R., Al-Dhabi N.A., Madamwar D. Response and resilience of soil microbial communities inhabiting in edible oil stress/contamination from industrial estates // *BMC Microbiology*. 2016. V. 1(16). P. 50.  
<https://doi.org/10.1186/s12866-016-0669-8>
43. Perdigão R., Almeida C.M.R., Santos F., Carvalho M.F., Mucha A.P. Optimization of an autochthonous bacteri-

- al consortium obtained from beach sediments for bioremediation of petroleum hydrocarbons // *Water*. 2020. V. 1(13). P. 66.  
<https://doi.org/10.3390/w13010066>
44. *Poliakova A.V., Chernov I.I., Panikov N.S.* Yeast biodiversity in hydromorphic soils with reference to grass-Sphagnum swamp in Western Siberia and the hammocky tundra region (Barrow, Alaska) // *Mikrobiologiya*. 2001. V. 5(70). P. 714–720.  
<https://doi.org/10.1023/A:1012328710111>
45. *Rosselló-Mora R.A., Lalucat J., García-Valdés E.* Comparative biochemical and genetic analysis of naphthalene degradation among *Pseudomonas stutzeri* strains // *Applied and Environmental Microbiology*. 1994. V. 3(60). P. 966–972.  
<https://doi.org/10.1128/aem.60.3.966-972.1994>
46. *Sambrook J., Russell D.W.* Molecular cloning: A laboratory manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2100 p.
47. *Sanseverino J., Applegate B.M., King J.M., Sayler G.S.* Plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene, and anthracene // *Applied and Environmental Microbiology*. 1993. V. 6(59). P. 1931–1937.  
<https://doi.org/10.1128/aem.59.6.1931-1937.1993>
48. *Timmis K.N., Lehrbach P.R., Harayama S., Don R.H., Mermod N., Bas S., Leppik R., Weightman A.J., Reincke W., Knackmuss H.J.* Analysis and manipulation of plasmid-encoded pathways for the catabolism of aromatic compounds by soil bacteria. Boston, MA: Springer US, 1985. P. 719–739.
49. *Tyagi M., Fonseca M.M.R. da, Carvalho C.C.C.R. de.* Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes // *Biodegradation*. 2011. V. 2(22). P. 231–241.  
<https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4>
50. *Viggor S., Juhanson J., Jõesaar M., Mitt M., Truu J., Vedler E., Heinaru A.* Dynamic changes in the structure of microbial communities in Baltic Sea coastal seawater microcosms modified by crude oil, shale oil or diesel fuel // *Microbiological Research*. 2013. V. 7(168). P. 415–427.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.02.006>
51. *Walter V., Sylđatk C., Hausmann R.* Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. N.Y.: Springer N.Y., 2010. P. 1–13.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_1)
52. *Yang Y., Wang J., Liao J., Xie S., Huang Y.* Abundance and diversity of soil petroleum hydrocarbon-degrading microbial communities in oil exploring areas // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015. V. 4(99). P. 1935–1946.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-014-6074-z>
53. *Zhou Z.-F., Wang M.-X., Zuo X.-H., Yao Y.-H.* Comparative investigation of bacterial, fungal, and archaeal community structures in soils in a typical oilfield in Jinchang, China // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2017. V. 1(72). P. 65–77.  
<https://doi.org/10.1007/s00244-016-0333-1>
54. *Zinjarde S., Apte M., Mohite P., Kumar A.R.* *Yarrowia lipolytica* and pollutants: Interactions and applications // *Biotechnology Advances*. 2014. V. 5(32). P. 920–933.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.008>

## Development of a Microbial Consortium for Bioremediation of Oil-Contaminated Soils of the Middle Ob Region

A. A. Vetrova<sup>1, \*</sup>, S. Ya. Trofimov<sup>2</sup>, R. R. Kinzhaev<sup>2</sup>, N. A. Avetov<sup>2</sup>, A. V. Arzamazova<sup>2</sup>,  
 I. F. Puntus<sup>1</sup>, O. I. Sazonova<sup>1</sup>, S. L. Sokolov<sup>1</sup>, R. A. Streletskii<sup>2</sup>, K. V. Petrikov<sup>1</sup>,  
 Ya. A. Deleган<sup>1</sup>, V. A. Samoylenko<sup>1</sup>, and A. E. Filonov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”,  
 G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences,  
 Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Soil Science, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: phdvetrova@gmail.com

Hydrocarbon-degrading microorganisms identified as representatives of the genera *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Kocuria*, *Raoultella* and *Candida* were isolated from oil-contaminated soil samples of the Middle Ob region. They were screened for the ability to degrade various classes of hydrocarbons in a wide temperature range (6–37°C), in acidic media (up to pH 4) and at increased salinity (up to 3%), for the ability to produce biosurfactants and for the presence of genes encoding enzymes responsible for hydrocarbon degradation. A microbial consortium was compiled as the basis of a biological preparation for bioremediation of oil-contaminated soils of the Middle Ob region, including strains of *Candida fluvialis* 24p-51, *Rhodococcus erythropolis* 24-44, *Acinetobacter calcoaceticus* 7-43 and *Pseudomonas extremaustralis* 7-31. The modes of cultivation and lyophilization of biomass were selected for these microorganisms. The efficiency of oil hydrocarbons degradation by the developed microbial consortium was evaluated in laboratory model systems. The degree of oil degradation by the microbial consortium in the liquid mineral medium was 56%, in the model soil – 22% for 10 days at 24°C.

**Keywords:** microorganisms-oil destructors, hydrocarbon-oxidizing activity, biopreparation