



Экология микроорганизмов / Ecology of microorganisms  
Оригинальная статья / Original article  
УДК 579.252.5:579.6  
DOI: 10.18470/1992-1098-2018-1-184-198

## БИОДЕГРАДАЦИЯ НЕФТИ КОНСОРЦИУМОМ ШТАММОВ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ В ЛАБОРАТОРНЫХ МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

<sup>1</sup>Анна А. Ветрова\*, <sup>2</sup>Владимир А. Забелин, <sup>1</sup>Анастасия А. Иванова,  
<sup>3</sup>Любовь А. Адаменко, <sup>1</sup>Янина А. Делеган, <sup>1</sup>Кирилл В. Петриков

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов  
имени Г.К. Скрыбина РАН, Пушино,  
Россия, phdvetrova@gmail.com

<sup>2</sup>ООО «Биоойл», Новосибирск, Россия

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт экспериментальной  
и клинической медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

**Резюме. Цель.** Оценить эффективность консорциума углеводородокисляющих бактерий в различных модельных системах. **Методы.** Для проведения экспериментов использовали два типа модельных систем: с жидкой минеральной средой и с нестерильной почвой. Для определения численности микроорганизмов применяли стандартную методику серийных разведений с высевом до отдельных колоний. Индивидуальные штаммы в консорциуме различали с помощью селективных сред с антибиотиками. Дegradацию нефти оценивали методом ИК-спектроскопии. **Результаты.** Консорциум способен к эффективной деструкции нефти в жидкой среде при 4°C и при 24°C, причём относительно контроля убыль нефти несколько выше при низкой температуре. При 50°C консорциум оказался неактивен. В модельных почвенных системах стимуляция аборигенных микроорганизмов путем внесения минеральных удобрений не приводила к значительным изменениям численности микроорганизмов-нефтедеструкторов, однако степень дегradации нефти увеличилась. При совместном внесении микробного консорциума и удобрения в почвенную систему наблюдалась наибольшая численность, как гетеротрофных бактерий, так и углеводородокисляющих штаммов. Степень деструкции нефти в этой системе также была наибольшей: 59% через 42 суток при комнатной температуре. **Выводы.** Разработанный бактериальный консорциум обладает высокой нефтедеградирующей активностью как при низких (4°C), так и при умеренных (18-25°C) температурах. В нестерильных почвенных системах микроорганизмы консорциума не подавляют местную биоту, сохраняя свою численность примерно на постоянном уровне, но при этом вносят основной вклад в дегradацию загрязнения.

**Ключевые слова:** бактериальный консорциум, биодегradация нефти, экологическая биотехнология, низкие температуры.

**Формат цитирования:** Ветрова А.А., Забелин В.А., Иванова А.А., Адаменко Л.А., Делеган Я.А., Петриков К.В. Биодегradация нефти консорциумом штаммов-нефтедеструкторов в лабораторных модельных системах // Юг России: экология, развитие. 2018. Т.13, N1. С.184-198. DOI: 10.18470/1992-1098-2018-1-184-198

## OIL BIODEGRADATION BY CONSORTIUM OF OIL DEGRADING MICROORGANISMS IN LABORATORY MODEL SYSTEMS

<sup>1</sup>Anna A. Vetrova\*, <sup>2</sup>Vladimir A. Zabelin, <sup>1</sup>Anastasia A. Ivanova,  
<sup>3</sup>Lyubov A. Adamenko, <sup>1</sup>Yanina A. Delegan, <sup>1</sup>Kirill V. Petrikov

<sup>1</sup>G.K. Scryabin institute of Biochemistry and  
Physiology of Microorganisms RAS,



Pushchino, Russia, phdvetrova@gmail.com

<sup>2</sup>JSC «Biooil», Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup>Institute of Experimental and Clinical Medicine SD RAS,  
Novosibirsk, Russia

**Abstract. Aim.** To evaluate the effectiveness of a consortium of hydrocarbon oxidizing bacteria in various model systems. **Methods.** Two types of model systems were used for carrying out the experiments: with a liquid mineral medium and with non-sterile soil. To determine the number of microorganisms, a standard method of serial dilutions with seeding to individual colonies was used. Individual strains in the consortium were distinguished using selective media with antibiotics. Oil degradation was assessed by IR spectrometry. **Results.** The consortium was capable to effective oil destruction in a liquid medium at 4°C and at 24°C, and with respect to control, oil loss is higher at low temperature. At 50°C, the consortium was inactive. In model non-sterile soil systems, the stimulation of native microorganisms by introducing mineral fertilizers did not lead to significant changes in the number of oil-degrading microorganisms but the degree of oil degradation increased. With the joint introduction of the microbial consortium and fertilization, the greatest number of both heterotrophic and oil-degrading strains was observed in the soil system. The degree of oil destruction in this system was also the highest: 59% at 42 days at room temperature. **Main conclusions.** The developed bacterial consortium has a high oil-degrading activity both at low (4°C) and moderate (18-25°C) temperatures. In non-sterile soil systems, the consortium's microorganisms do not inhibit the local biota, maintaining their numbers at about constant levels, but at the same time they make the main contribution to pollution degradation.

**Keywords:** bacterial consortium, oil biodegradation, ecological biotechnology, low temperatures.

**For citation:** Vetrova A.A., Zabelin V.A., Ivanova A.A., Adamenko L.A., Delegan Ya.A., Petrikov K.V. Oil biodegradation by consortium of oil degrading microorganisms in laboratory model systems. *South of Russia: ecology, development*. 2018, vol. 13, no. 1, pp. 184-198. (In Russian) DOI: 10.18470/1992-1098-2018-1-184-198

## ВВЕДЕНИЕ

Современный микробиологический метод очистки загрязненных нефтью территорий, основанный на применении высокоэффективных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов, выделенных из загрязненных природных объектов, широко применяется в мировой практике рекультивационных мероприятий [1-3].

Важнейшим фактором, влияющим на активность процесса разрушения углеводов в почве нефтеокисляющими микроорганизмами, являются почвенно-климатические условия [4]. Эффективная деструкция различных углеводов микроорганизмами, внесенными в окружающую среду в составе биопрепарата, происходит лишь в тех случаях, когда в почве (или других средах, в месте интродукции микроорганизмов) будут созданы благоприятные условия для их жизнедеятельности и развития (источники питания, необходимый тепловой и водный режимы, и т.д.), т.е. микроорганизмам необходимо создать благоприятную экологическую нишу, в которой они

будут проявлять интенсивную углеводородокислительную активность [5-7].

Нефть является многокомпонентной системой, состоящей из большого количества индивидуальных соединений. Один штамм не способен к полной утилизации всех углеводов нефти и нефтепродуктов, так как не обладает необходимым набором ферментов, поэтому использование нескольких бактерий, различающихся спектром утилизируемых углеводородных субстратов, обеспечивает более полную деградацию нефти. Для очистки от загрязнений нефтью и нефтепродуктами используют биопрепараты, состоящие как из одного вида бактерий [8], так и из смешанных культур [9; 10], способных к деградации широкого спектра углеводов. Так же было показано, что использование штаммов, содержащих конъюгативные плазмиды биodeградации, повышает эффективность при рекультивации нефтезагрязненных экосистем за счёт распространения генов деградации среди аборигенной микрофлоры [11-13].



В состав ранее отобранного консорциума [13; 14] вошли плазмидосодержащие микроорганизмы родов *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и *Acinetobacter*, способные к деградации углеводородов нефти при пониженной температуре. Перечисленные выше роды бактерий часто входят в состав ассоциаций и биопрепаратов для очистки окру-

жающей среды от нефти и нефтепродуктов [9; 15-17].

**Цель данной работы** – изучить динамику численности интродуцированных микроорганизмов и оценить эффективность деградации нефти консорциумом плазмидосодержащих штаммов при различных температурах в жидкой минеральной среде и модельной почве.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Бактериальные штаммы

В работе использовали консорциум микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти следующего состава: *Rhodococcus*

*erythropolis* S26, *Acinetobacter baumannii* 1B, *Acinetobacter baumannii* 7 и *Pseudomonas putida* F701 [13; 14]. Характеристика штаммов приведена в табл. 1.

Таблица 1

Бактериальные штаммы, входящие в состав бактериального консорциума, используемого в работе

Table 1

Bacterial strains – components of the bacterial consortium used in the research

Штамм Strain	Фенотипическая характеристика Phenotyp characteristic	Источник получения штамма Source of the strain
<i>Acinetobacter baumannii</i> 1B	Nb <sup>r</sup> Cef <sup>r</sup> Bzp <sup>r</sup> Rif <sup>r</sup> Amp <sup>r</sup> Tcr <sup>r</sup> Oct <sup>+</sup> Dec <sup>+</sup> Non <sup>+</sup> Tol <sup>+</sup> Npht <sup>+</sup> Dsf <sup>+</sup> Hde <sup>+</sup>	ООО «Биоойл» JSC «Biooil»
<i>Acinetobacter baumannii</i> 7	Nb <sup>r</sup> Cef <sup>r</sup> Bzp <sup>r</sup> Rif <sup>r</sup> Amp <sup>r</sup> Trp <sup>r</sup> Oct <sup>+</sup> Dec <sup>+</sup> Non <sup>+</sup> Npht <sup>+</sup> Dsf <sup>+</sup> Hde <sup>+</sup>	ООО «Биоойл» JSC «Biooil»
<i>Rhodococcus erythropolis</i> S26	Sm <sup>r</sup> Rif <sup>r</sup> Oct <sup>+</sup> Dec <sup>+</sup> Non <sup>+</sup> Npht <sup>+</sup> Dsf <sup>+</sup> Hde <sup>+</sup>	Лаборатория биологии плазмид, ИБФМ РАН Laboratory of Plasmid Biology, IBPM RAS
<i>Pseudomonas putida</i> F701	Tcr <sup>r</sup> Cef <sup>r</sup> Bzp <sup>r</sup> Nb <sup>r</sup> Cam <sup>+</sup> Benz <sup>+</sup> Tol <sup>+</sup> Phn <sup>+</sup> Sal <sup>+</sup> Nah <sup>+</sup> Npht <sup>+</sup> Dsf <sup>+</sup> Hde <sup>+</sup>	Лаборатория биологии плазмид, ИБФМ РАН Laboratory of Plasmid Biology, IBPM RAS

Способность к росту на: Phn<sup>+</sup> – фенантрене, Nah<sup>+</sup> – нафталине, Sal<sup>+</sup> – салицилате, Dsf<sup>+</sup> – дизельном топливе, Npht<sup>+</sup> – нефти, Hde<sup>+</sup> – гексадекане, Tol<sup>+</sup> – толуоле, Oct<sup>+</sup> – октане, Dec<sup>+</sup> – декане, Non<sup>+</sup> – нонане, Benz<sup>+</sup> – бензоате, Cam<sup>+</sup> – камфаре. Резистентность к антибиотикам: Cefr – цефазолину, Bzpr – бензилпеницилину, Nbr – новобиоцину, Tcr – тетрациклину, Rifr – рифампицину, Trp – триметаприму, Smr – стрептомицину, Ampr – ампицилину.

Ability to grow on: Phn<sup>+</sup> – phenanthrene, Nah<sup>+</sup> – naphthalene, Sal<sup>+</sup> – salicylate, Dsf<sup>+</sup> – diesel fuel, Npht<sup>+</sup> – crude oil, Hde<sup>+</sup> – hexadecane, Tol<sup>+</sup> – toluene, Oct<sup>+</sup> – octane, Dec<sup>+</sup> – decane, Non<sup>+</sup> – nonane, Benz<sup>+</sup> – benzoate, Cam<sup>+</sup> – camphor.

Antibiotic resistance: Cefr – cefazolin, Bzpr – benzylpenicilin, Nbr – novobiocin, Tcr – tetracycline, Rifr – rifampicin, Trp – trimetaprim, Smr – streptomycin, Ampr – ampicilin.

### Питательные среды

Для выращивания микроорганизмов использовали синтетическую минеральную среду Эванса [18], полноценную среду Лурья-Бертани (ЛБ) [19], полноценную среду Кинга Б (КБ) [20]. Соответствующие агаризованные среды готовили, добавляя к жидкой среде 2% бактериологического агара.

### Условия культивирования микробного консорциума в жидкой минеральной среде

В колбу Эрленмейера объемом 750 мл добавляли 100 мл среды Эванса, вносили инокулят в виде суспензии микроорганизмов до конечной концентрации  $(1-5) \times 10^6$  КОЕ/мл, затем добавляли нефть до конечной



концентрации 15% весовых. Колбы помещали на орбитальную качалку (200 об./мин.) при соответствующей температуре (4°C, 24°C и 50°C).

Аналогично готовили контрольные системы без внесения микроорганизмов для оценки абиотической убыли нефти.

Каждую систему готовили в трёх повторях.

#### Приготовление модельных почвенных систем

Почву для приготовления модельных систем брали вблизи г. Пущино Московской области. Характеристика почвы: лугово-аллювиальная; углерод – 2,75%; гумус – 4,74%; общий азот на 100 г почвы – 225 мг; P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> на 100 г почвы – 500 мг; K<sub>2</sub>O на 100 г почвы – 16,88 мг; pH водной вытяжки – 8,16.

Проводили определение влагоемкости почвы согласно методике, описанной в Вадюниной и Корчагиной [21].

Почву просеивали через сито с диаметром отверстий 2,0 мм. Навеску почвы массой 0,5 кг помещали в пластиковый контейнер объемом 1 л (толщина слоя почвы 10 см), туда же вносили 10 г нефти (уровень загрязнения 2%) и тщательно перемешивали шпателем.

Минеральное удобрение («Нитроаммофоска», ООО «Фаско+», Россия) вносили в количестве 0,75 г на 0,5 кг почвы.

Для внесения инокулята бактерии выращивали в жидкой среде ЛБ до конца экспоненциальной фазы роста (1 10<sup>9</sup> КОЕ/мл среды). Затем, используя стандарт мутности, суспензию бактерий разводили фосфатным буфером до концентрации (1-5) 10<sup>8</sup> КОЕ/мл. Приготовленную таким образом бактериальную суспензию добавляли в дистиллированную воду, и затем воду с инокулятом вносили в почву. Количество вносимой бактериальной суспензии рассчитывали так, чтобы конечная концентрация составляла приблизительно 1 10<sup>6</sup> микроорганизмов на 1 г сухой почвы.

Всего были приготовлены следующие модельные почвенные системы, каждая в трёх повторях:

система 1 – нестерильная почва, загрязненная нефтью;

система 2 – нестерильная почва, загрязненная нефтью, с добавлением удобрения;

система 3 – нестерильная почва, загрязненная нефтью, с добавлением удобрения и с внесением консорциума штаммов нефтедеструкторов.

Приготовленные системы инкубировали при комнатной температуре (18-25°C). Ежедневно проводилось рыхление почвы стерильным шпателем, измерение температуры и добавление воды для поддержания влажности на уровне 25% от максимальной влагоемкости. Интродукцию микробного консорциума осуществляли вторично, через 4 недели.

#### Определение численности микроорганизмов

Численность микроорганизмов определяли по содержанию колониеобразующих единиц (КОЕ). Для этого использовали метод последовательных десятикратных разведений в фосфатном буфере с последующим высевом на различные агаризованные среды и подсчетом выросших колоний. Для систем с жидкой средой первое разведение готовили, отбирая 0,5 мл среды и добавляя их к 4,5 мл фосфатного буфера; для почвенных систем – отбирая 1 г усреднённой пробы, добавляя их к 9 мл фосфатного буфера и перемешивая на вортексе в течение 1 минуты.

Общую численность гетеротрофных микроорганизмов определяли на богатой агаризованной среде ЛБ. Оценку численности штаммов-нефтедеструкторов определяли на минеральной среде Эванса с добавлением дизельного топлива или нефти в качестве единственного источника углерода и энергии. Измерение численности отдельных микроорганизмов, входящих в состав консорциума, проводили с использованием посева на селективные среды для подсчёта КОЕ. Для получения селективных сред в среду ЛБ вносили соответствующие антибиотики (указана концентрация в мкг/мл среды): для штаммов *Acinetobacter baumannii* 1B и *Pseudomonas putida* F701 – тетрациклин, 10, для *Rhodococcus erythropolis* S26 – стрептомицин, 100, для *Acinetobacter baumannii* 7 – триметаприм, 100. Кроме этого, штамм F701 идентифицировали после посева на агаризованную среду Кинга Б по ярко-зелёному свечению колоний в ультрафиолетовом свете ( $\lambda=254$  нм).



### Определение степени деструкции нефти

Деграцию нефти исследуемыми штаммами оценивали по суммарному показателю убыли нефти методом ИК-спектрометрии относительно контрольных систем без интродуцированных микроорганизмов [22]. Измерение проводили на нефтяном анализаторе АН-2 (Санкт-Петербург) по прилагаемой к прибору методике.

### Обработка результатов

Статистическая обработка проводилась с помощью программы Microsoft Office Excel 2003.

Все экспериментальные данные приведены в виде среднего арифметического с доверительным интервалом для  $P = 0.95$ , рассчитанных по результатам измерения соответствующего параметра в трёх повторениях.

## ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее коллективом авторов был проведён анализ физиологических, метаболических и деструктивных свойств эффективных микроорганизмов-нефтедеструкторов из коллекций лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН и ЗАО «Биоойл», а именно, анализ способности к росту в жидкой минеральной среде с высоким содержанием нефти и нефтепродуктов, наличия катаболических плазмид, способности к биодегградации нефти в широком диапазоне температур, продукции биосурфактантов и устойчивости к изменениям значений pH. В результате был составлен консорциум, в который вошли следующие отобранные в ходе исследования штаммы: *Rhodococcus erythropolis* S26, *Acinetobacter baumannii* 1B, *Acinetobacter*

*baumanii* 7 и *Pseudomonas putida* F701 [13; 14].

Важнейшими параметрами, описывающими поведение консорциума, являются динамика численности микроорганизмов и эффективности дегградации нефти.

Для изучения указанных свойств была проведена серия экспериментов в различных модельных системах.

Для изучения свойств составленного консорциума при его интродукции в нефтезагрязнённые системы динамики численности интродуцированных микроорганизмов и оценки эффективности дегградации нефти отобранным консорциумом штаммов были проведены эксперименты в лабораторных условиях.

### Деструкция нефти микробным консорциумом в жидкой минеральной среде при различных температурах

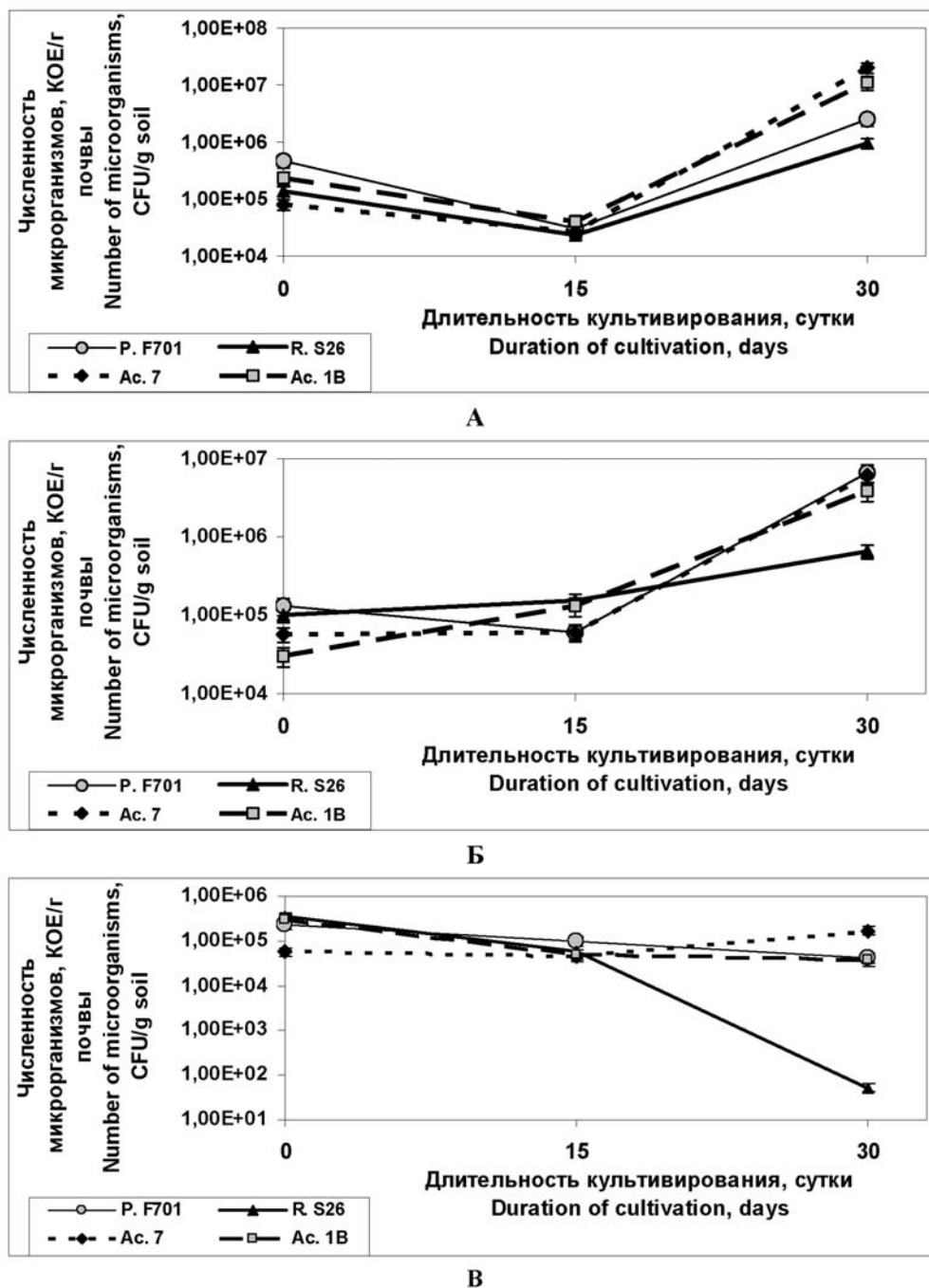
Эффективность деструкции нефти консорциумом и его жизнеспособность оценивали при трёх температурах: 4°C, 24°C и 50°C. Деструкцию нефти оценивали в сравнении с абиотическим контролем, а для проверки жизнеспособности для каждого штамма, входящего в состав консорциума, строили отдельные кривые роста.

При температуре 4°C ростовые кривые каждого штамма практически совпадали, демонстрируя падение численности примерно в 10 раз к 15 суткам и последующий активный рост к 30 суткам (рис. 1А). Это типичная картина динамики численности бактерий, обусловленная необходимостью адаптации микроорганизмов к экстремальным условиям роста. При 24°C сходная динамика (падение численности, а затем рост)

наблюдалась для штамма *Pseudomonas putida* F701, что также свидетельствует о наличии адаптационного периода, позволяющего бактериям приспособиться к условиям токсичного воздействия компонентов нефти (рис. 1Б). Численность штамма *Acinetobacter baumannii* 7 к 15 суткам сохранилась на прежнем уровне и увеличилась только к 30 суткам, а два оставшихся штамма, *Acinetobacter baumannii* 1B и *Rhodococcus erythropolis* S26, демонстрировали стабильный рост.

При культивировании консорциума при температуре 50°C очень слабый рост был отмечен только для штамма *Acinetobacter baumannii* 7 (рис. 1В). *Pseudomonas putida* F701 и *Acinetobacter baumannii* 1B продемонстрировали снижение численности на порядок, а *Rhodococcus erythropolis* S26 практически утратил жизнеспособность.





**Рис.1.** Динамика численности микроорганизмов при культивировании бактериального консорциума при температурах 4°C (А), 24°C (Б) и 50 °С (В) в жидкой минеральной среде Эванса с 15% нефти

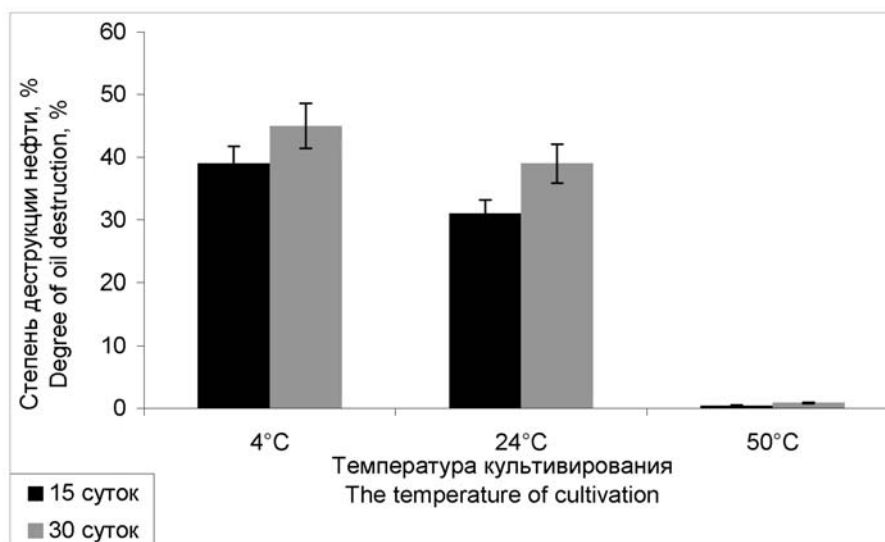
**Fig.1.** Dynamics of the number of microorganisms during the cultivation of the bacterial consortium at temperatures: 4°C (А), 24°C (Б) and 50°C (В) in Evans liquid medium with 15% oil

Деградационную активность консорциума оценивали по суммарному показателю убыли нефти в жидкой среде, определяемому методом ИК-спектрии. В системах при 4°C и 24°C основная доля убыли нефти

наблюдалась уже через 15 суток (рис. 2) и составила 39% и 31%, соответственно. К 30 суткам суммарная степень дегградации в этих системах увеличилась лишь на 6% и 8% соответственно. Данный эффект достигался,

возможно, за счет деградации микроорганизмами, в первую очередь,  $n$ -алканов (до  $C_{12}$ ) и циклических соединений с одним кольцом – легких фракций нефти. Вероятно, снижение скорости деградации во второй половине эксперимента обусловлено

уменьшением количества легких биодоступных углеводов, а оставшиеся в среде тяжелые фракции поллютанта являлись персистентными и более трудноусваиваемыми компонентами нефти.



**Рис.2. Степень деструкции нефти при культивировании бактериального консорциума при температурах 4°C, 24°C и 50 °C в жидкой среде Эванса с 15% нефти**

**Fig.2. Degree of oil destruction during cultivation of the bacterial consortium at temperatures of 4°C, 24°C and 50°C in Evans liquid medium with 15% oil**

Наибольшая степень деградации наблюдалась в системе при температуре 4°C и составила 44% через 30 дней относительно контроля без микроорганизмов, тогда как при 24°C она составляла 39% (рис. 2., табл. 2). Следует отметить, что деградацию нефти в исследуемых системах оценивали относительно контроля, в котором происходили процессы абиотической убыли. Причем, абиотическая убыль при температуре 4°C была меньше, чем при 24°C, как через 15 дней, так и через 30 суток (табл. 2). Соответственно, остаточная концентрация нефти в контроле при низкой положительной температуре была больше, чем остаточное количество нефти при 24°C. Следует полагать, что как в контрольной системе 1, так и в опытной системе 2 при температуре 4°C, количество доступных и легкоокисляемых бактериями углеводов превышало содержание этих соединений в контроле при температуре 24°C. Несмотря на то, что при комнатной температуре 24°C микроорганизмы консорциума находились в опти-

мальных для развития условиях, в среде в большей степени присутствовали трудно-разлагаемые углеводороды средней и тяжелой фракций нефти, а соответственно, количество доступных для утилизации легких фракций нефти было меньше.

Ранее нами было показано [13], что микроорганизмы, входящие в состав консорциума способны к деструкции углеводов нефти при температуре 42°C. В настоящей работе была изучена способность микробного консорциума к деградации нефти при температуре 50°C. Степень деструкции нефти оказалась менее 1% на 30 суток (табл. 2, рис. 2). Это вызвано, с одной стороны, падением метаболической активности бактерий из-за температурного воздействия, что видно по данным кривых роста (рис. 1В), с другой, быстро испаряются углеводороды легких фракций, из-за чего легкоусвояемые субстраты становятся недоступны даже для микроорганизмов, способных к росту при таких температурах, как штамм *Acinetobacter baumannii* 7.



Таблица 2

Степень деструкции нефти в жидкой минеральной среде  
(начальный уровень загрязнения – 15%) при разных температурах,  
в процентах от начального уровня

Table 2

Degree of oil destruction in liquid mineral environment (initial pollution level – 15%)  
at different temperatures, in percentage of the initial level

Температура и длительность инкубирования Temperature and duration of incubation  Модельная система Test system	4°C		24°C		50°C	
	15 дней 15 days	30 дней 30 days	15 дней 15 days	30 дней 30 days	15 дней 15 days	30 дней 30 days
Контроль (абиотическая убыль) Control (abiotic loss)	4 ± 1	13 ± 3	14 ± 4	19 ± 2	16 ± 1	20 ± 2
Система с интродуцированным бактериальным консорциумом System with introduction of bacterial consortium	45 ± 3	57 ± 2	46 ± 4	58 ± 1	17 ± 3	21 ± 2
Дегградация нефти относительно контрольной системы Oil degradation relative to the control system	39 ± 3	45 ± 1	31 ± 4	39 ± 2	0.5 ± 0.3	0.9 ± 0.3

#### Деструкция нефти микробным консорциумом в почве при комнатной температуре

Вопросам исследования микробной дегградации углеводородов нефти в настоящее время уделяется значительное внимание во всём мире. Это связано с использованием полученных результатов в технологиях биоремедиации почв, загрязнённых нефтью [13; 23]. Зарубежные исследователи в основном фокусируют внимание на методах стимуляции аборигенных микроорганизмов-деструкторов *in situ* за счёт внесения органических и минеральных удобрений [24; 25]. В тоже время, интродукция микроорганизмов – эффективных деструкторов нефти может значительно увеличить дегградативный потенциал аборигенной микрофлоры, так как при взаимодействии бактерий в окружающей среде происходит обмен генетической информацией.

Для изучения динамики численности штаммов консорциума и оценки эффективности дегградации нефти использовали следующие системы (каждая в трёх повторях):

Эксперимент проводили для трёх различных систем (см. «Материалы и методы»):

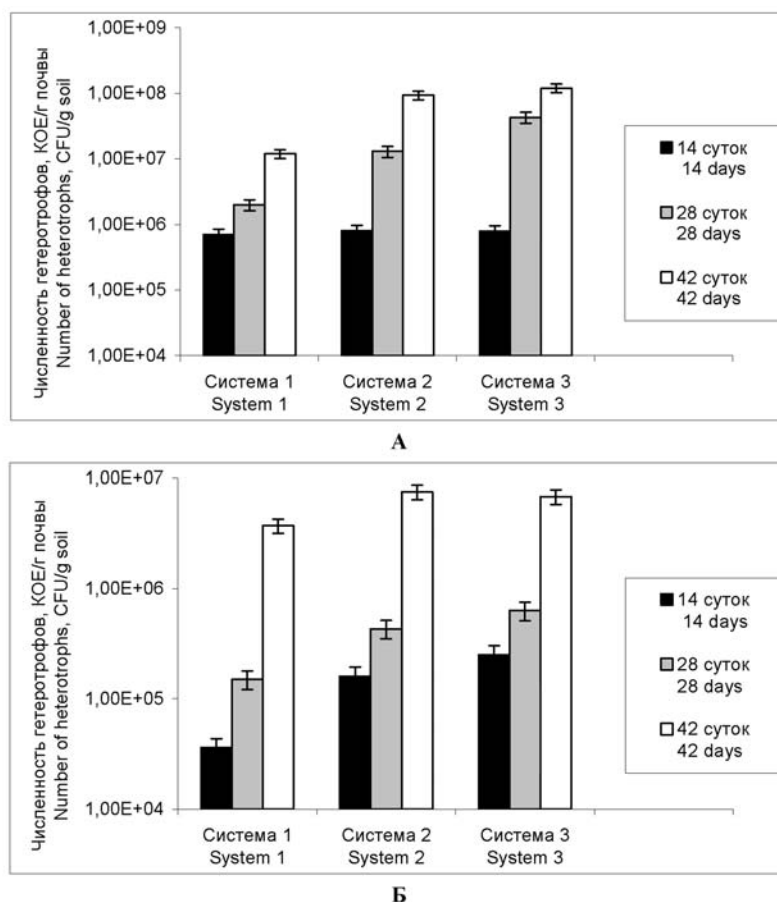
система 1 – контроль для оценки дегградации нефти аборигенными почвенными микроорганизмами;

система 2 – контроль с внесённым удобрением для оценки его влияния на дегградацию нефти аборигенными микроорганизмами;

система 3 – для оценки дегградации нефти исследуемым консорциумом в присутствии удобрения.

Следует отметить, что численность гетеротрофных микроорганизмов зависит от токсичности грунта, запасов минеральных и органических ресурсов и других факторов [26]. Численность гетеротрофов в начале эксперимента составляла  $4,2 \times 10^5$  КОЕ/г сухой почвы, а количество аборигенных нефтедеструкторов –  $2,8 \times 10^4$  КОЕ/г почвы. Изменение общей численности микроорганизмов в контрольном варианте (система 1) не было значительным и составило  $(7,2-7,9) \times 10^5$  КОЕ/г почвы, однако внесение минеральных удобрений (система 2) способствовало ее постепенному возрастанию от  $2,1 \times 10^6$  до  $4,3 \times 10^7$  КОЕ/г почвы. В модельных почвенных системах с интродуцированным консорциумом и удобрениями (система 3) численность гетеротрофов увеличивалась уже в первой половине эксперимента и сохранялась на высоком уровне, что указывает на формирование благоприятных условий для развития этой группы микроорганизмов (рис. 3А).





**Рис.3.** Динамика численности гетеротрофных микроорганизмов (А) и микроорганизмов-нефтедеструкторов (Б) в нестерильных почвенных системах с начальным уровнем загрязнения 2% нефти при комнатной температуре. Система 1 – нестерильный контроль. Система 2 – с внесением нитроаммофоски. Система 3 – с внесением нитроаммофоски и интродукцией бактериального консорциума  
**Fig.3.** Dynamics of the number of heterotrophic microorganisms (А) and oil degrading microorganisms (Б) in non-sterile soil systems with an initial contamination level of 2% oil at room temperature. System 1 – non-sterile control. System 2 – with the introduction of nitroamophoski. System 3 – with introduction of nitroamophoska and introduction of the bacterial consortium

Общая концентрация гетеротрофов в системе 3 к 28 суткам эксперимента составила  $9,3 \times 10^7$  КОЕ/г почвы и оставалась примерно на этом уровне в течение следующих 14 дней. Общая численность бактерий в системе 2 достигла своего максимума ( $3,3 \times 10^7$  КОЕ/г почвы) через 28 дней культивирования и в дальнейшем практически не изменялась. Сравнение результатов по численности штаммов-нефтедеструкторов в системах 1 и 2, полученных в ходе эксперимента, показало, что стимуляция природного сообщества микроорганизмов путем внесения минеральных удобрений незначительно увеличивала численность этой группы бактерий (рис. 3Б). Наибольшая численность микро-

организмов зарегистрирована в системе 3 при комплексном использовании бактериального консорциума и минерального удобрения, что хорошо согласуется с данными по степени деструкции (рис. 3, табл. 3).

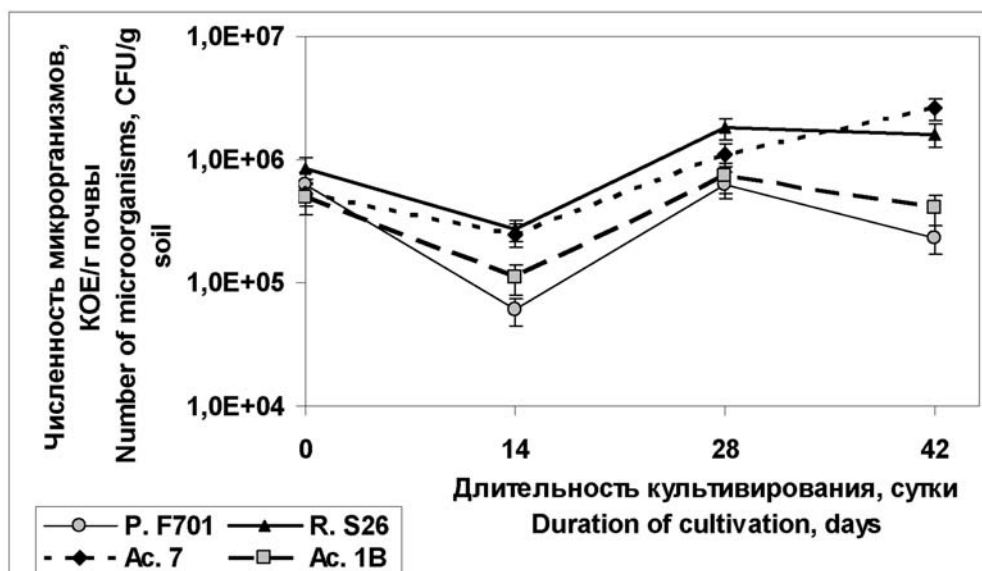
Численность нефтедеструкторов во всех модельных системах достигла своего максимума в течение 28 суток культивирования и почти не изменялась до конца эксперимента.

На рис. 4 представлены кривые роста микроорганизмов исследуемого консорциума в модельной почвенной системе 3. Из данных рис. 3 следует, что численность нефтедеструкторов в системах 1 и 2 увеличилась почти на 1 порядок в течение экспе-



римента. Прирост численности микробного консорциума (рис. 4) был весьма незначительным (с  $1 \times 10^6$  КОЕ/г почвы до  $5 \times 10^6$  КОЕ/г почвы) и составил приблизительно

0,5 порядка, однако при этом степень деградации нефти в системе 3 была больше почти в 2 раза по сравнению с системой 2 и в 3 раза – с системой 1.



**Рис.4.** Динамика численности микроорганизмов консорциума в модельных почвенных нестерильных системах, загрязненных 20 г нефти на кг почвы  
**Fig.4.** Dynamics of the number of microorganisms of the consortium in model soil non-sterile systems contaminated with 20 g of crude oil per kg of soil

Сравнение данных о численности микроорганизмов-нефтедеструкторов (рис. 3Б) в системах 2 и 3 показало увеличение их количества на 1 порядок, возможно, вследствие присутствия катаболических плазмид в клетках интродуцируемых бактерий консорциума. Ранее в работах сотрудников лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН показано, что в сайтах, загрязненных нефтепродуктами, происходит увеличение популяции микроорганизмов, содержащих катаболические плазмиды [27]. В последние годы возрос интерес к изучению горизонтального переноса катаболических плазмид в окружающей среде [13; 28-33], продемонстрировано, что конъюгативные плазмиды деградации углеводов при интродукции в загрязненный сайт бактерий, содержащих эти плазмиды, способны распространяться среди других аборигенных микроорганизмов [13; 14].

Из данных рис. 4 следует, что в течение первых 14 дней наблюдалось снижение численности интродуцированных микроорганизмов. Максимум численности практически всех штаммов, кроме штамма *Ac. 7* (продолжался дальнейший рост), был до-

стигнут через 28 дней. Следует отметить, что деградация нефти в этот период составила 25% и 50%, в системах 2 и 3, соответственно. Постепенный рост численности углеводородокисляющих микроорганизмов (нефтедеструкторов) отмечался и в системах с применением только удобрения без интродукции исследуемого консорциума (рис. 3Б), что соответствует литературным данным [34].

Снижение концентрации нефти за счет абиотической убыли загрязнителя и эндогенной деградации поллютанта составило 23% за 42 суток. На процесс биodeградации нефти в модельной почвенной системе значительный эффект оказывало внесение минерального удобрения («Нитроаммофоска») – убыль нефти составила 31%. В наших экспериментах (рис. 3) численность гетеротрофных микроорганизмов возрастала с увеличением степени биodeградации углеводов в почве.

В результате комплексной интродукции исследуемого консорциума и удобрений степень деградации поллютанта составила 59%, а при внесении только «Нитроаммофоски» – 31% (табл. 3). Таким образом, сов-



местное использование консорциума на основе углеводородоокисляющих микроорганизмов и удобрения позволило почти в 2 раза повысить эффективность очистки нефтезагрязненной почвы. Аналогичные результаты, были получены Биккининой с

соавт. [34], показавшими, что одновременное использование удобрений и биопрепаратов способствует повышению степени деградации загрязнителя и увеличению численности углеводородоокисляющих микроорганизмов.

Таблица 3

Степень деструкции нефти в модельных почвенных системах через 42 суток при комнатной температуре (18-25°C), начальный уровень загрязнения – 2%

Table 3

Degree of oil destruction in model soil systems after 42 days at room temperature (18-25°C), initial pollution level – 2%

Модельная система Test system	Степень деструкции Degree of destruction %
Контроль без интродуцированных микроорганизмов (система 1) Control without introduced microorganisms (system 1)	23 ± 4
Система с нитроаммофоской (система 2) System with fertilizer (nitroammophoska) (system 2)	31 ± 3
Система с интродуцированным бактериальным консорциумом и нитроаммофоской (система 3) System with introduction of bacterial consortium and fertilizer (nitroammophoska) (system 3)	59 ± 2

## ВЫВОДЫ

В результате выполненных исследований была доказана эффективность деградации нефти отобраным микробным консорциумом. В модельных системах с жидкой средой высокая степень деструкции (более 30%) была показана не только для умерен-

ной температуры (24°C), но и для низкой (4°C). При внесении консорциума в нестерильные почвенные системы степень деструкции нефти возрастала в два раза по сравнению с системой без консорциума.

**Благодарности:** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-00610 мол\_a.

**Acknowledgements:** The reported study was funded by RFBR according to the research project No. 16-34-00610 мол\_a.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Алехин В.Г., Фахрутдинов А.И., Малышкина Л.А., Ситников А.В., Емцев В.Т., Хотянович А.В. Сравнительная эффективность деструкции нефтепродуктов различными биопрепаратами при разных уровнях загрязнения торфогрунтов // Биологические ресурсы и природопользование. 1999. Вып. 3. С. 96–106.
- Wang Q., Zhang Sh., Li Y., Klassen W. Potential approaches to improving biodegradation of hydrocarbons for bioremediation of crude oil pollution // Journal of environmental protection. 2011. N 2. P. 47–55. doi: 10.4236/jep.2011.21005
- Кузнецов А.Е., Градова Н.Б., Лушников С.В., Энгельхарт М., Вайссер Т., Чеботаева М.В. Прикладная экобиотехнология. М.: Бионим, 2010. 629 с.
- Ермоленко З.М., Чугунов В.А., Герасименко В.Н. Влияние некоторых факторов окружающей среды на выживаемость внесенных бактерий, разрушающих нефтяные углеводороды // Биотехнология. 1997. N 5. С. 12–19.
- Ботоер М. Микробные сообщества в мерзлотных почвах Сибири // Тезисы докладов Второй международной конференции «Освоение Севера и проблемы рекультивации», Сыктывкар, 1997. С. 117–119.
- Stewart R.S. Distribution of multiple oil tolerant and oil degrading bacteria around a site of natural crude oil seepage // Texas Journal of Science. 1997. N 4. P. 49.
- Киреева Н.А., Новоселова Е.И., Хазиев Ф.Х. Ферменты азотного обмена в нефтезагрязненных почвах // Известия РАН. Сер. Биология. 1997. N 6. С. 203–206.
- Коронелли Т.В., Комарова Т.И., Ильинская В.В., Кузьмин Ю.И., Кирсанов Н.Б., Яненко А.С. Интродукция бактерий рода *Rhodococcus* в тундровую почву, загрязненную нефтью // Прикладная



- биохимия и микробиология. 1997. Т.33, N 2. С. 198–201.
9. Нечаева И.А., Гафаров А.Б., Филонов А.Е., Пунтус И.Ф., Боронин А.М. Составление и отбор ассоциаций микроорганизмов, способных к деградации углеводов нефти при пониженной температуре // Известия Тульского государственного университета. Серия Химия. 2006. Вып. 6. С. 179–188.
10. Суровцева Е.Г., Ивойлов В.С., Беляев С.С. Дegradaция ароматической фракции нефти ассоциацией грамположительных и грамотрицательных бактерий // Микробиология. 1997. Т. 66, N 1. С.78–83.
11. Ветрова А.А., Нечаева И.А., Игнатова А.А., Пунтус И.Ф., Аринбасаров М.У., Филонов А.Е., Боронин А.М. Влияние каталитических плазмид на физиологические параметры бактерий рода *Pseudomonas* и эффективность биодеструкции нефти // Микробиология. 2007. Т. 76, N 3. С. 354–360.
12. Ветрова А.А., Овчинникова А.А., Пунтус И.Ф., Филонов А.Е., Боронин А.М. Интенсификация биодegradaции нефти плазмидосодержащими штаммами *Pseudomonas* в модельных почвенных системах // Биотехнология. 2009. N 4. С. 82–90.
13. Filonov A., Ovchinnikova A., Vetrova A., Nechaeva I., Petrikov K., Vlasova E., Akhmetov L., Puntus I., Shestopalov A., Zabelin V., Boronin A. Oil-Spill Bioremediation, Using A Commercial Biopreparation "MicroBak" and A Consortium Of Plasmid-Bearing Strains "V&O" With Associated Plants. In: Introduction to Enhanced Oil Recovery (EOR) Processes and Bioremediation of Oil-Contaminated Sites. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. P. 291–318.
14. Филонов А.Е., Овчинникова А.А., Ветрова А.А., Нечаева И.А., Петриков К.В., Власова Е.П., Росс Д.В., Ахметов Л.И., Пунтус И.Ф., Забелин В.А., Боронин А.М. Микроорганизмы и биопрепараты для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений // Материалы международной конференции «Окружающая среда и человек: друзья или враги?», Пушино, 22–24 июня, 2011. С. 189–192.
15. Андреева И.С., Емельянова Е.К., Загребельный С.Н., Олькин С.Е., Резникова И.К., Репин В.Е. Психротолерантные штаммы-нефтедеструкторы для биоремедиации почв и водной среды // Биотехнология. 2006. N 1. С. 43–52.
16. Карпенко Е.В., Вильданова-Марцишин Р.И., Щеглова Н.С., Пирог Т.П., Волошина И.Н. Перспективы использования бактерий рода *Rhodococcus* и микробных поверхностно-активных веществ для деградации нефтяных загрязнений // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42, N 2. С. 175–179.
17. Кобзев Е.Н., Петрикевич С.Б., Шкидченко А.Н. Исследование устойчивости ассоциации микроорганизмов-нефтедеструкторов в открытой системе // Прикладная биохимия и микробиология. 2001. Т.37, N 4. С. 413–417.
18. Evans C., Herbert D., Tempest D. The continuous cultivation of microorganisms. 2. Construction of a Chemostat // Methods in Microbiology. 1970. V. 2, N 4. P. 277–327.
19. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 480 p.
20. King E., Ward M., Raney D. Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescein // J. Lab. Clin. Med. 1954. V. 44, N 2. P. 301–307.
21. Вадюнина А.Ф., Корчагина З.А. Методы исследования физических свойств почв. М.: Агропромиздат, 1986. 416 с.
22. Определение концентрации нефти в почве методом инфракрасной спектrophотометрии: Методические указания. Под ред. Кучурова Л.С., Максаква Е.И. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. 16 с.
23. Megharaj M., Ramakrishnan B., Venkateswarlu K., Sethunathan N., Naidu R. Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective // Environ Int. 2011. V. 37, N 8. P. 1362–1375. doi: 10.1016/j.envint.2011.06.003
24. Tyagi M., da Fonseca M.M., de Carvalho C.C. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes // Biodegradation. 2011. V. 22, N 2. P. 231–241. doi: 10.1007/s10532-010-9394-4
25. Perelo L.W. In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments // J Hazard Mater. 2010. vol. 177, iss. 1–3. P. 81–89. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.12.090
26. Успабаева А.А. Изучение влияния углеводов нефти на распространения почвенной микрофлоры // Вестник Евразийского национального университета им. Л.Н. Гумилева. 2011. N 2. С. 281–285.
27. Boronin A.M., Kosheleva I.A. Diversity of naphthalene biodegradation systems in soil Bacteria. In: Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Berlin: Springer, 2009. P. 1155–1165.
28. Yano H., Miyakoshi M., Ohshima K., Tabata M., Nagata Y., Hattori M., Tsuda M. Complete nucleotide sequence of TOL plasmid pDK1 provides evidence for evolutionary history of IncP-7 catabolic plasmids // J Bacteriol. 2010. vol. 192, N 17. P. 4337–4347. doi: 10.1128/JB.00359-10



29. Ikuma K., Gunsch C.K. Functionality of the TOL plasmid under varying environmental conditions following conjugal transfer // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013. vol. 97, N 1. P. 395–408. doi: 10.1007/s00253-012-3949-8

30. Ikuma K., Gunsch C.K. Genetic bioaugmentation as an effective method for in situ bioremediation: functionality of catabolic plasmids following conjugal transfers // *Bioengineered.* 2012. vol. 3, N. 4. P. 236–241. doi: 10.4161/bioe.20551

31. Li S., Zhao H., Li Y., Niu S., Cai B. Complete nucleotide sequence of plasmid pND6-2 from *Pseudomonas putida* ND6 and characterization of conjugative genes // *Gene.* 2013. vol. 512, N 1. P. 148–156. doi: 10.1016/j.gene.2012.09.065

32. Shintani M., Takahashi Y., Yamane H., Nojiri H. The behavior and significance of degradative plas-

mids belonging to Inc groups in *Pseudomonas* within natural environments and microcosms // *Microbes Environ.* 2010. vol. 25, N 4. P. 253–265.

33. Bathe S., Hausner M. Plasmid-mediated bioaugmentation of wastewater microbial communities in a laboratory-scale bioreactor // *Methods Mol Biol.* 2010. N 599. P. 185–200. doi: 10.1007/978-1-60761-439-5\_12

34. Биккина А.Г., Логинов О.Н., Силищев Н.Н., Бакаева М.Д., Галимзянова Н.Ф., Бойко Т.Ф. Повышение эффективности процесса биоремедиации отработанной отбеливающей земли, загрязненной углеводородами, при совместном использовании комплекса биопрепаратов «Ленойл» и «Азолен» // *Биотехнология.* 2006. N 5. С. 57–62.

## REFERENCES

1. Alekhin V.G., Fakhrutdinov A.I., Malysheva L.A., Sitnikov A.V., Emtsev V.T., Khotyanovich A.V. Comparative efficiency of destruction of petroleum products by various biological preparations at different levels of pollution of peat lands. In: *Biologicheskiye resursy i prirodopol'zovaniye* [Biological resources and nature management]. 1999, iss. 3, pp. 96–106. (In Russian)

2. Wang Q., Zhang Sh., Li Y., Klassen W. Potential approaches to improving biodegradation of hydrocarbons for bioremediation of crude oil pollution. *Journal of environmental protection*, 2011, no. 2, pp. 47–55. doi: 10.4236/jep.2011.21005

3. Kuznetsov A.E., Gradova N.B., Lushnikov S.V., Engelhart M., Weisser T., Chebotaeva M.V. *Prikladnaya ekobiotehnologiya* [Applied ecobiotechnology]. Moscow, Bionom Publ., 2010, 629 p. (In Russian)

4. Ermolenko Z.M., Chugunov V.A., Gerasimenko V.N. Influence of some environmental factors on the survival of introduced bacteria that destroy petroleum hydrocarbons. *Biotehnologiya* [Biotechnology]. 1997, no. 5, pp. 12–19. (In Russian)

5. Botoer M. Mikrobnyye soobshchestva v vechomerzlykh pochvakh Sibiri [Microbial communities in permafrost soils of Siberia]. *Tezisy vtoroy Mezhdunarodnoy konferentsii «Razvitiye severa i rekul'tivatsii»*, Syktyvkar, 1997 [Abstracts of the Second International Conference "Development of the North and Recultivation Problems", Syktyvkar, 1997]. Syktyvkar, 1997, pp. 117–119. (In Russian)

6. Stewart R.S. Distribution of multiple oil tolerant and oil degrading bacteria around a site of nonnatural crude oil seepage. *Texas Journal of Science.* 1997, no. 4, 49 p.

7. Kireeva N.A., Novoselova E.I., Khaziev F.Kh. The enzymes of nitrogen exchange in oil-

contaminated soils. *Izvestiya RAN. Seriya Biologiya* [Proceedings of the RAS. Series Biology]. 1997, no. 6, pp. 203–206. (In Russian)

8. Koronelli T.V., Komarova T.I., Il'inskii V.V., Kuz'min Yu.I., Kirsanov N.B., Yanenko A.S. Introduction of bacteria of the genus *Rhodococcus* into oil-contaminated tundra soils. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* [Applied Biochemistry and Microbiology]. 1997, vol. 33, no. 2, pp. 198–201. (In Russian)

9. Nechaeva I.A., Gafarov A.B., Filonov A.E., Puntus I.F., Boronin A.M. Compilation and selection of associations of microorganisms capable of degradation of petroleum hydrocarbons at a lower temperature. *Izvestiya Tul'skogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya Khimiya* [Proceedings of the Tula State University. Series Chemistry]. 2006, iss. 6, pp. 179–188. (In Russian)

10. Surovtseva E.G., Ivoilov V.S., Belyaev S.S. Degradation of the aromatic fraction of oil by an association of gram-positive and gram-negative bacteria. *Mikrobiologiya* [Microbiology]. 1997, vol. 66, no. 1, pp. 78–83. (In Russian)

11. Vetrova A.A., Nechaeva I.A., Ignatova A.A., Puntus I.F., Arinbasarov M.U., Filonov A.E., Boronin A.M. Effect of catabolic plasmids on physiological parameters and efficiency of oil destruction by *Pseudomonas* bacteria. *Mikrobiologiya* [Microbiology]. 2007, vol. 76, no. 3, pp. 354–360.

12. Vetrova A.A., Ovchinnikova A.A., Puntus I.F., Filonov A.E., Boronin A.M. Enhanced Biodegradation of Crude Oil by *Pseudomonas* Plasmid-Bearing Strains in Model Soil Systems. *Biotehnologiya* [Biotechnology]. 2009, no. 4, pp. 82–90. (In Russian)

13. Filonov A., Ovchinnikova A., Vetrova A., Nechaeva I., Petrikov K., Vlasova E., Akhmetov L., Puntus I., Shestopalov A., Zabelin V., Boronin A. Oil-





- Spill Bioremediation, Using A Commercial Biopreparation "MicroBak" And A Consortium Of Plasmid-Bearing Strains "V & O" With Associated Plants. In: Introduction to Enhanced Oil Recovery (EOR) Processes and Bioremediation of Oil-Contaminated Sites. Rijeka, Croatia, InTech, 2012, pp. 291–318.
14. Filonov A.E., Ovchinnikova A.A., Vetrova A.A., Nechaeva I.A., Petrikov K.V., Vlasova E.P., Ross D.V., Akhmetov L.I., Puntus I.F., Zabelin V.A., Boronin A.M. Mikroorganizmy i biologicheskiye sredstva dlya ochistki okruzhayushchey sredy ot neftyanykh zagryazneniy [Microorganisms and biological preparations for cleaning the environment from oil pollution]. *Materialy konferentsii «Okruzhayushchaya sreda i chelovek: druz'ya ili vragi?»*, Pushchino, 22–24 iyunya 2011 [Proceedings of the international conference "Environment and Man: Friends or Enemies?", Pushchino, 22–24 June, 2011]. Pushchino, 2011, pp. 189–192. (In Russian)
15. Andreeva I.S., Emelianova E.K., Zagrebelnyi S.N., Ol'kin S.E., Reznikova I.K., Repin V.E. Bioremediation of Oil-Polluted Soils and Water with Psychrotolerant Destructing Strains. *Biotehnologiya [Biotechnology in Russia]*. 2006, no. 1, pp. 43–52. (In Russian)
16. Karpenko E.V., Vil'danova-Marcishin R.I., Scheglova N.S., Pirog T.P., Voloshina I.N. The prospects of using bacteria of the genus *Rhodococcus* and microbial surfactants for the degradation of oil pollutants. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya [Applied Biochemistry and Microbiology]*. 2006, vol. 42, no. 2, pp. 175–179. (In Russian)
17. Kobzev E.N., Petrikevich S.B., Shkidchenko A.N. Study of the stability association of oil-degrading microorganisms in an open system. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya [Applied Biochemistry and Microbiology]*. 2001, vol. 37, no. 4, pp. 413–417. (In Russian)
18. Evans C., Herbert D., Tempest D. The continuous cultivation of microorganisms. 2. Construction of a Chemostat. *Methods in Microbiology*. 1970, vol. 2, no. 4, pp. 277–327.
19. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 480 p.
20. King E., Ward M., Raney D. Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 1954, vol. 44, no. 2, pp. 301–307.
21. Vadyunina A.F., Korchagina Z.A. *Metody issledovaniya fizicheskikh svoystv pochv [Methods for studying the physical properties of soils]*. Moscow, Agropromizdat Publ., 1986, 416 p. (In Russian)
22. Kuchurova L.S., Maksakova E.I., eds. *Opredele niye kontsentratsii nefli v pochve metodom infrakrasnoy spektrofotometrii [Determination of oil concentration in soil by infrared spectrophotometry: Methodological guidelines]*. Moscow, Federal Center for Hygiene and Epidemiology of the RCS Publ., 2006, 16 p. (In Russian)
23. Megharaj M., Ramakrishnan B., Venkateswarlu K., Sethunathan N., Naidu R. Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. *Environ Int*, 2011, vol. 37, no. 8, pp. 1362–1375. doi: 10.1016/j.envint.2011.06.003
24. Tyagi M., da Fonseca M.M., de Carvalho C.C. Bioaugmentation and biostimulation Strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 2011, vol. 22, no. 2, pp. 231–241. doi: 10.1007/s10532-010-9394-4
25. Perelo L.W. In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *J Hazard Mater*, 2010, vol. 177, iss. 1–3, pp. 81–89. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.12.090
26. Uspabaeva A.A. Study of the influence of oil hydrocarbons on the distribution of soil microflora. *Vestnik Yevraziyskogo natsional'nogo universiteta. im. L.N. Gumileva [Bulletin of the L.N. Gumilev Eurasian National University]*. 2011, no. 2, pp. 281–285. (In Russian)
27. Boronin A.M., Kosheleva I.A. Diversity of naphthalene biodegradation systems in soil. In: *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Berlin, Springer, 2009, pp. 1155–1165.
28. Yano H., Miyakoshi M., Ohshima K., Tabata M., Nagata Y., Hattori M., Tsuda M. Complete nucleotide sequence of TOL plasmid pDK1 provides evidence for the evolutionary history of IncP-7 catabolic plasmids. *J Bacteriol*, 2010, vol. 192, no. 17, pp. 4337–4347. doi: 10.1128/JB.00359-10
29. Ikuma K., Gunsch C.K. Functionality of the TOL plasmid under the environmental conditions following conjugal transfer. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, vol. 97, no. 1, pp. 395–408. doi: 10.1007/s00253-012-3949-8
30. Ikuma K., Gunsch C.K. Genetic bioaugmentation as an effective method for in situ bioremediation: functionality of catabolic plasmids the following conjugal transfers. *Bioengineered*, 2012, vol. 3, no. 4, pp. 236–241. doi: 10.4161/bioe.20551
31. Li S., Zhao H., Li Y., Niu S., Cai B. Complete nucleotide sequence of plasmid pND6-2 from *Pseudomonas putida* ND6 and characterization of conjugative genes. *Gene*, 2013, vol. 512, no. 1, pp. 148–156. doi: 10.1016/j.gene.2012.09.065
32. Shintani M., Takahashi Y., Yamane H., Nojiri H. The behavior and significance of the degradative plasmids to the groups in *Pseudomonas* within natural environments and microcosms. *Microbes Environ*. 2010, vol. 25, no. 4, pp. 253–265.



33. Bathe S., Hausner M. Plasmid-mediated bio-augmentation of wastewater microbial communities in a laboratory-scale bioreactor. *Methods Mol Biol*, 2010, no. 599, pp. 185–200. doi: 10.1007/978-1-60761-439-5\_12

34. Bikkinina A.G., Loginov O.N., Silishchev N.N., Bakaeva M.D., Galimzianova N.F., Boiko T.F. Im-

provement of Bioremediation of Worked-out Leaching Soil Polluted with Hydrocarbons upon a Combined Use of a Biopreparation Complex Lenoil + Azolen. *Biotekhnologiiya* [Biotechnology in Russia], 2006, no. 5, pp. 57–62. (In Russian)

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

##### Принадлежность к организации

**Владимир А. Забелин** – кандидат технических наук, директор ООО «Биоойл», 630007, Новосибирская область, г. Новосибирск, ул. Октябрьская, д. 42, офис 611, тел.: (383) 381-45-13.

**Анна А. Ветрова\*** – кандидат биологических наук, ФГБУ науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина Российской академии наук, 142290, Россия, г. Пушкино, пр. Науки, 5; тел.: (4967) 31-85-64, e-mail: phdvetrova@gmail.com

**Анастасия А. Иванова** – кандидат биологических наук, ФГБУ науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина Российской академии наук, г. Пушкино, Россия.

**Любовь А. Адаменко** – м.н.с., ФГБУ науки Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия.

**Янина А. Делеган** – кандидат биологических наук, ФГБУ науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина Российской академии наук, г. Пушкино, Россия.

**Кирилл В. Петриков** – кандидат химических наук, ФГБУ науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрыбина Российской академии наук, г. Пушкино, Россия.

##### Критерии авторства

Владимир А. Забелин, Любовь А. Адаменко подготовили концепцию работы, участвовали в анализе материала, написании статьи и несут ответственность за плагиат и самоплагиат. Анна А. Ветрова выполняла определение численности микроорганизмов и степени деструкции нефти, написала и корректировала рукопись перед подачей в редакцию. Анастасия А. Иванова выполняла определение численности микроорганизмов и степени деструкции нефти, участвовала в анализе материала. Янина А. Делеган подготавливала питательные среды и модельные системы. Кирилл В. Петриков анализировал материал, редактировал рукопись.

##### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 28.10.2017

Принята в печать 18.12.2017

#### AUTHORS INFORMATION

##### Affiliations

**Vladimir A. Zabelin** – Candidate of Technical Sciences, Director, Biooil Ltd., 630007, Russia, Novosibirsk, ul. Oktjabrskaja, 42, office 611, tel. (383) 381-45-13.

**Anna A. Vetrova\*** – Candidate of Biological Sciences, G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, 142290, Russia, Pushchino, pr. Nauki, 5; tel. (4967) 31-85-64, e-mail: phdvetrova@gmail.com

**Anastasia A. Ivanova** – Candidate of Biological Sciences, G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino, Russia.

**Lyubov A. Adamenko** – junior researcher, Institute of Experimental and Clinical Medicine SD RAS, Novosibirsk, Russia.

**Yanina A. Delegan** – Candidate of Biological Sciences, G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino, Russia.

**Kirill V. Petrikov** – Candidate of Chemical Sciences, G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino, Russia.

##### Contribution

Vladimir A. Zabelin, Lyubov A. Adamenko prepared the concept of work, participated in the analysis of the material, writing of the article and is responsible for plagiarism. Anna A. Vetrova performed the determination of the number of microorganisms and the degree of destruction of oil, wrote and corrected the manuscript before submitting to the editorial office. Anastasia A. Ivanova performed the determination of the number of microorganisms and the degree of destruction of oil, participated in the analysis of the material. Yanina A. Delegan prepared media and model systems. Kirill V. Petrikov analyzed the material, participated in writing of the article, and edited the manuscript.

##### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Received 28.10.2017

Accepted for publication 18.12.2017