

Влияние ризосферных бактерий-нефтедеструкторов на биологическое состояние почвы, загрязнённой нефтью

© 2021. М. С. Третьякова¹, к. б. н., н. с., Л. А. Беловежец², к. б. н., с. н. с., Л. Г. Соколова¹, к. б. н., с. н. с., С. Ю. Зорина¹, к. б. н., с. н. с., Ю. А. Маркова¹, д. б. н., г. н. с., зав. лабораторией,
¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, 664033, Россия, г. Иркутск, ул. Лермонтова, д. 132,
²Институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН, 664033, Россия, г. Иркутск, ул. Фаворского, д. 1,
 e-mail: marina-tretjakova@yandex.ru

Нефть является опасным химическим загрязнителем почвы. В результате нефтеразливов происходит угнетение роста и развития растений, микроорганизмов и почвенных животных. В настоящее время широко применяют биологический метод, основанный на использовании эффективных микроорганизмов, в частности, выделенных из ризосферы растений, для восстановления загрязнённых территорий. В статье представлены результаты модельных экспериментов по влиянию ризосферных микроорганизмов-нефтедеструкторов на биологические свойства нефтезагрязнённой почвы и их использованию для целей биоремедиации. Показано, что в присутствии штаммов, относящихся к р. *Rhodococcus*, *Acinetobacter* и их консорциума, происходило повышение эффективности разложения углеводов нефти в загрязнённой почве. Убыль нефти в загрязнённой почве за 60 суток эксперимента при внесении исследованных штаммов увеличивалась на 19–24% относительно контроля и составила 62–68% от исходного её содержания. Наблюдалось увеличение активности каталазы, пероксидазы, полифенолоксидазы, происходило повышение эмиссии углекислого газа. Штаммы микроорганизмов в основном способствовали снижению фитотоксичности почвы. На протяжении всего эксперимента наименьшей фитотоксичностью обладала почва, инокулированная *Rhodococcus erythropolis* штамм 108. Выделенные ризосферные штаммы депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, ФГБУН «ФИЦ «Пушчинский научный центр биологических исследований РАН» и являются перспективными для использования в качестве биоремедиантов нефтезагрязнённых территорий Сибирского федерального округа.

Ключевые слова: ризосферные микроорганизмы-нефтедеструкторы, нефтезагрязнённая почва, биологические свойства почвы, биодеструкция нефти.

Effect of rhizospheric oil-degrading bacteria on the biological state of oil-polluted soil

© 2021. M. S. Tretyakova¹ ORCID: 0000-0003-1222-3589,
 L. A. Belovezhets² ORCID: 0000-0001-5922-3397, L. G. Sokolova¹ ORCID: 0000-0002-5178-1404,
 S. Yu. Zorina¹ ORCID: 0000-0002-7587-981X, Yu. A. Markova¹ ORCID: 0000-0001-7767-4204,
¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry Siberian Branch of RAS, 132, Lermontova St., Irkutsk, Russia, 664033,
²Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry, Siberian Branch of RAS, 1, Favorsky St., Irkutsk, Russia, 664033,
 e-mail: marina-tretjakova@yandex.ru

Environmental pollution with oil and oil products is a serious issue faced both by Russia and by the whole world. Currently, the use of microbiological preparations, which include indigenous microorganisms adapted to climatic and environmental conditions of a particular region, is an effective way to remediate oil-polluted soils. The use of microorganisms isolated from plant rhizosphere is promising for soil bioremediation due to their high biotechnological potential. The paper presents the results of model experiments on the influence of strains of oil-degrading microorganisms (*Rhodococcus erythropolis* 108, *Acinetobacter guillouiae* 112, *Acinetobacter guillouiae* 114) isolated from wheatgrass rhizosphere and their consortium on the purification of oil-polluted soil. The changes in soil enzymatic and respiratory activity are the indicators of its phytotoxicity. After 60 days of the experiment, the oil loss in oil-polluted soil with the introduction of the studied strains was shown to increase by 19–24% relative to the control and amount to 62–68% of its initial content.

The enzymatic and respiratory activity of the soil increased at the background of oil destruction by the microorganisms. Treatment of oil-polluted soil with the strains of oil-degrading bacteria contributed to an increase in its phytotoxicity in the early stages of radish (*Raphanus sativus*) ontogeny. This was especially characteristic of the *A. guillouiae* 112 strain. The soil inoculated with *R. erythropolis* 108 had the least phytotoxicity throughout the experiment. For the first time, the obtained rhizospheric strains of the genera *Rhodococcus* and *Acinetobacter* were shown to accelerate the process of purifying the soil from oil and be able to be used for bioremediation of oil-polluted soils.

Keywords: rhizospheric oil-degrading microorganisms, oil-polluted soil, soil biological properties, oil biodegradation.

В результате аварий на нефтепроводах, при добыче и транспортировке в России ежегодно теряется около 1,5 млн т нефти. В 80% случаев загрязнению подвергается почва [1]. При загрязнении почвы нефтепродуктами изменяются её физические и морфологические свойства, нарушается воздухообмен, затрудняется поступление воды, питательных веществ, необходимых для жизнедеятельности почвенных животных и растений [2, 3]. Почвы теряют своё плодородие и сельскохозяйственное значение [4, 5].

Для ускорения процесса самоочищения в настоящее время применяют углеводородокисляющие микроорганизмы (УОМ), обладающие повышенной способностью к деградации ксенобиотиков [6–8]. Этот метод признан в мире как наиболее экологически безопасный для окружающей среды и экономически целесообразный [9–11]. Активные виды УОМ выделяют непосредственно из нефтезагрязнённой почвы. Также имеются данные, что в ризосфере растений численность УОМ, способных к деградации загрязняющих веществ, существенно больше, чем вне её [12, 13].

В Иркутском регионе за последние годы зарегистрировано около 30 нефтяных аварий. На данной территории имеется 12 крупных нефтяных месторождений, проходят две линии подземного магистрального нефтепровода, которые проложены на сельскохозяйственных и лесных землях [14]. Поэтому создание микробиологического препарата, разработанного для восстановления нефтезагрязнённых территорий, является актуальным для Иркутской области. Важно при внедрении таких препаратов знать влияние выделенных УОМ на биологические свойства почвы, что позволит спрогнозировать эффективность данного препарата для очищения почвы от загрязнителя.

Цель работы – изучение влияния ризосферных микроорганизмов-нефтедеструкторов на биологические свойства загрязнённой почвы.

Объекты и методы исследования

В работе использовали штаммы УОМ, выделенные из ризосферы пырея (*Elytrigia*

repens), произрастающего на территории Иркутской области [15]: *Rhodococcus erythropolis* 108, *Acinetobacter guillouiae* 112, *Acinetobacter guillouiae* 114.

Варианты эксперимента: 1. Незагрязнённая почва; 2. Почва, загрязнённая нефтью, без бактерий; 3. Загрязнённая почва (ЗП) + *R. erythropolis* 108; 4. ЗП + *A. guillouiae* 112; 5. ЗП + *A. guillouiae* 114; 6. ЗП + консорциум микроорганизмов (*R. erythropolis* 108+ *A. guillouiae* 112+ *A. guillouiae* 114). Один раз в неделю проводили отбор образцов на определение интенсивности эмиссии CO₂, один раз в две недели определяли фитотоксичность почвенного экстракта; через 5 и 60 сут после внесения нефти – ферментативную активность почвы (пероксидаза, каталаза, полифенолоксидаза), через 60 сут – убыль нефти.

Для эксперимента использовали нестерильную серую лесную почву (гумус 7,52%; N_{общ} 0,35%, C : N = 15, рН_{вод.} 5,7), в количестве 200 г, которую загрязняли нефтью в концентрации 10% об. Затем почву инокулировали суспензией соответствующего микроорганизма-деструктора или их ассоциацией с титром 10⁷ КОЕ/г, в объёме 20 мл. Эксперимент проводили в течение 60 сут при температуре 26 °С в климатической камере CLF Plant Climatics (Германия). Для определения фитотоксичности почвенного раствора использовали семена редиса (*Raphanus sativus*, сорт Дуро краснодарское) [16]. Количество взошедших семян учитывали на 3-й день. Активность каталазы определяли перманганатометрически, полифенолоксидазы и пероксидазы – иодометрически [17]. Определение эмиссии CO₂ проводили абсорбционным методом, адаптированным для условий *in exp* [18]. Остаточное содержание нефти в почве анализировали через 60 сут гравиметрическим методом [19]. Статистическая обработка данных выполнена с использованием стандартного пакета программы Microsoft Excel 2010.

Результаты и обсуждение

Одним из основных показателей эффективности работы бактерий-нефтедеструкторов

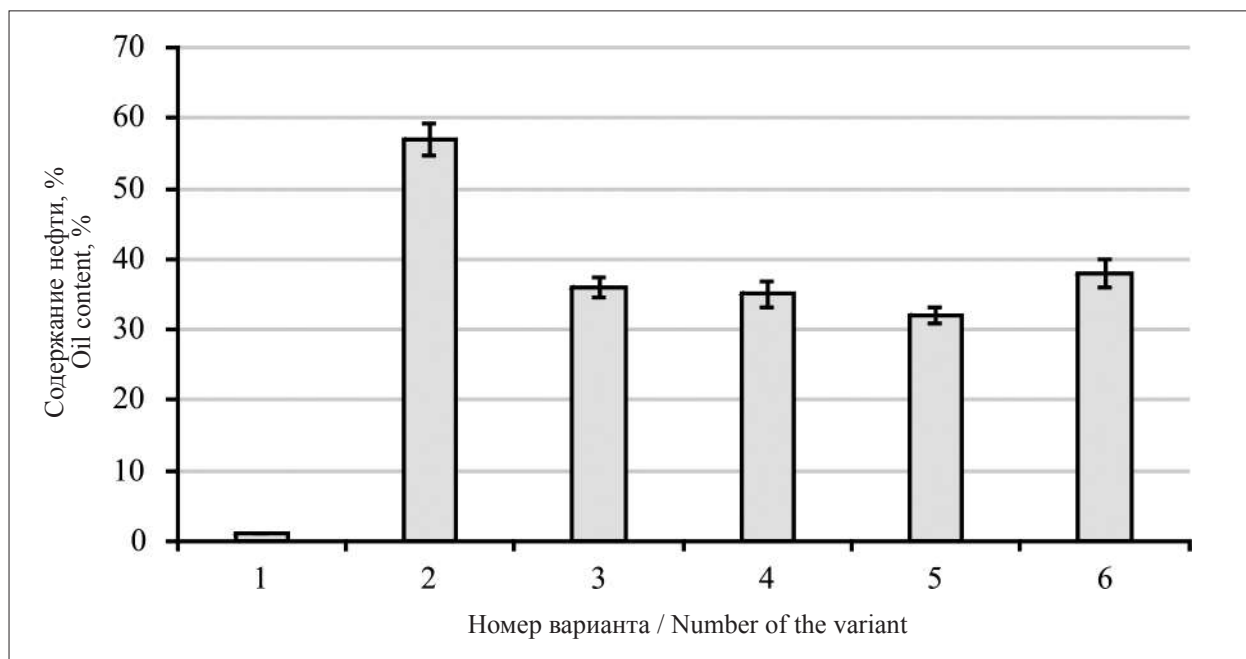


Рис. 1. Остаточное содержание нефти в почве через 60 сут эксперимента (%).
Исходное содержание нефти – 100%
Fig. 1. Residual oil content in the soil after 60 days of the experiment (%).
The initial oil content is 100%

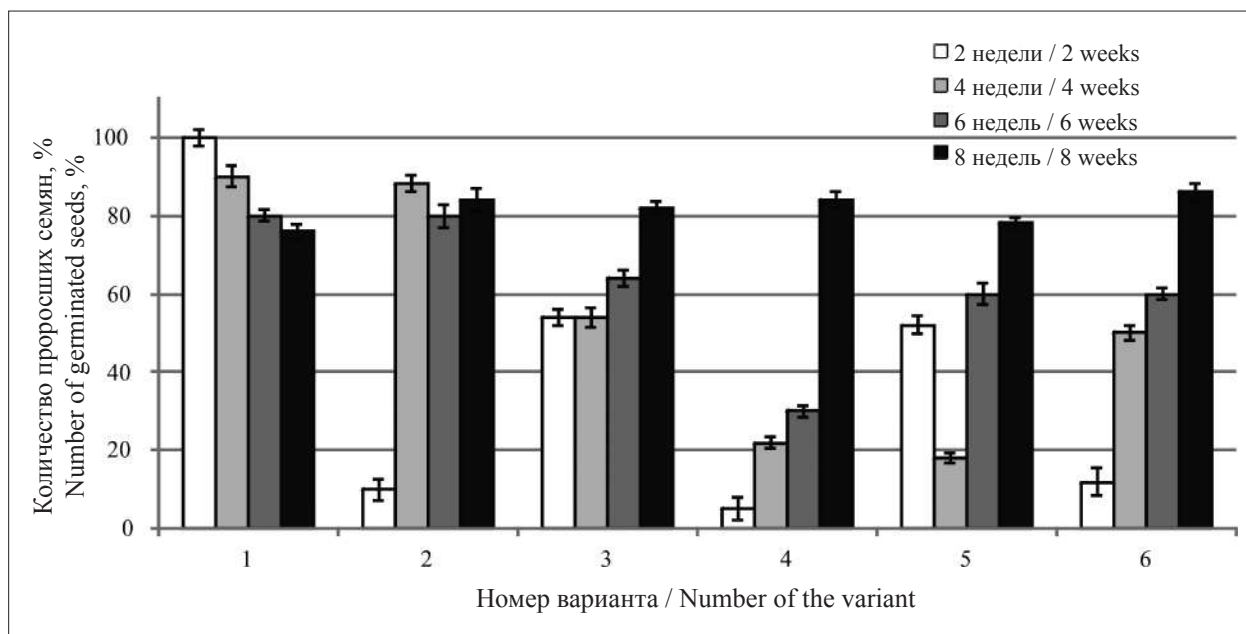


Рис. 2. Определение фитотоксичности почвенного раствора по количеству проросших семян редиса (%)
Fig. 2. Determination of phytotoxicity of soil solution by number of germinated radish seeds (%)

является убыль нефти в почве. Было показано, что при внесении УОМ убыль нефти составляла 19–24% относительно контроля (рис. 1).

В процессе биодegradации нефти образуется большое количество высокотоксичных

соединений, поэтому определение уровня фитотоксичности может служить косвенным показателем активности разложения нефти в почве. В данном эксперименте о фитотоксичности судили по оценке прямого токсического

эффекта водной почвенной вытяжки на семена редиса (*R. sativus*) (рис. 2).

Отмечено, что через две недели после внесения нефти, почвенный раствор оказался наиболее токсичным для прорастания семян редиса. Возможно, это связано с быстро разлагаемой фракцией нефти, продукты деструкции которой неблагоприятно действуют на растения [20]. Обработка нефтезагрязнённой почвы отдельными штаммами бактерий-нефтедеструкторов существенно изменяла её фитотоксичность. Наиболее высокой она была в варианте с внесением штамма *A. guillouiae* 112. Ранее было установлено [15], что этот штамм обладал высокой скоростью биодеструкции нефти. Снижение фитотоксичности в этом варианте происходило только в конце эксперимента. В присутствии *A. guillouiae* 114 максимальное токсическое воздействие наблюдалось через четыре недели. Несмотря на принадлежность этих штаммов к одному виду, они используют разные пути разложения ароматических соединений нефти [21], что объясняет различия в динамике фитотоксичности. Наименьшей фитотоксичностью на протяжении всего эксперимента обладала почва, инокулированная штаммом *R. erythropolis* 108, что может быть связано с его защитным действием

на растения в условиях нефтезагрязнения [22]. В случае использования консорциума УОМ в первые две недели происходило резкое увеличение фитотоксичности почвы, затем она постепенно снижалась. Через восемь недель фитотоксичность почв практически не отличалась от контроля (рис. 3).

Для выявления эффективности биоремедиации нефтезагрязнённых почв используют показатели пероксидазной, каталазной и полифенолоксидазной активности почвы [23, 24]. Незагрязнённая почва практически не обладала пероксидазной активностью, тогда как активность полифенолоксидазы и каталазы находилась на среднем уровне (рис. 3). Через пять суток после внесения нефти в почву активность исследуемых ферментов резко возрастала. По-видимому, это может быть связано с активизацией почвенной микрофлоры, вынужденной в короткие сроки нейтрализовать большое количество токсичных соединений. Через два месяца эксперимента активность исследуемых ферментов снижалась. Обработка загрязнённой почвы штаммом *A. guillouiae* 112 приводила к возрастанию активности всех трёх ферментов. Как показано ранее [15, 21], данный штамм характеризуется высокой скоростью деструкции ароматической

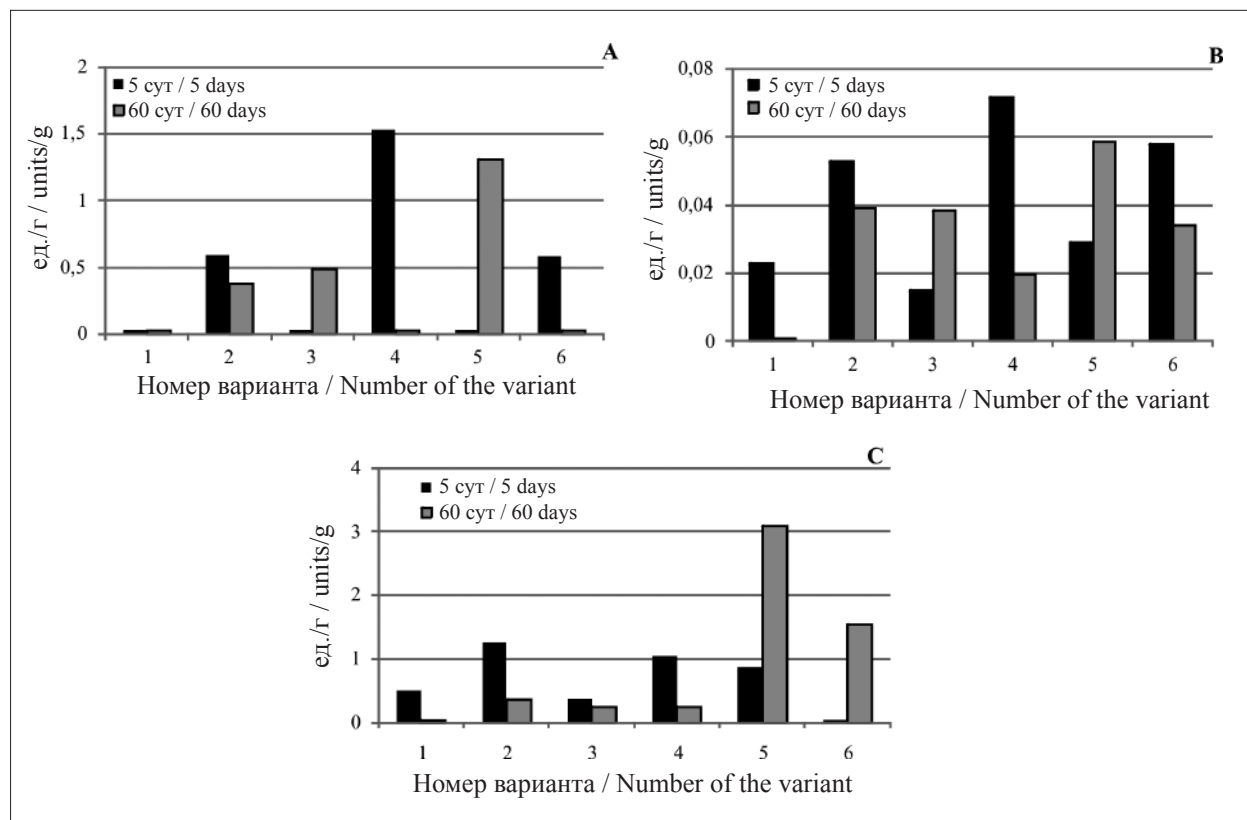


Рис. 3. Ферментативная активность почвы: А – пероксидаза, В – каталаза, С – полифенолоксидаза
Fig. 3. Enzymatic activity of the soil: A – peroxidase, B – catalase, C – polyphenol oxidase

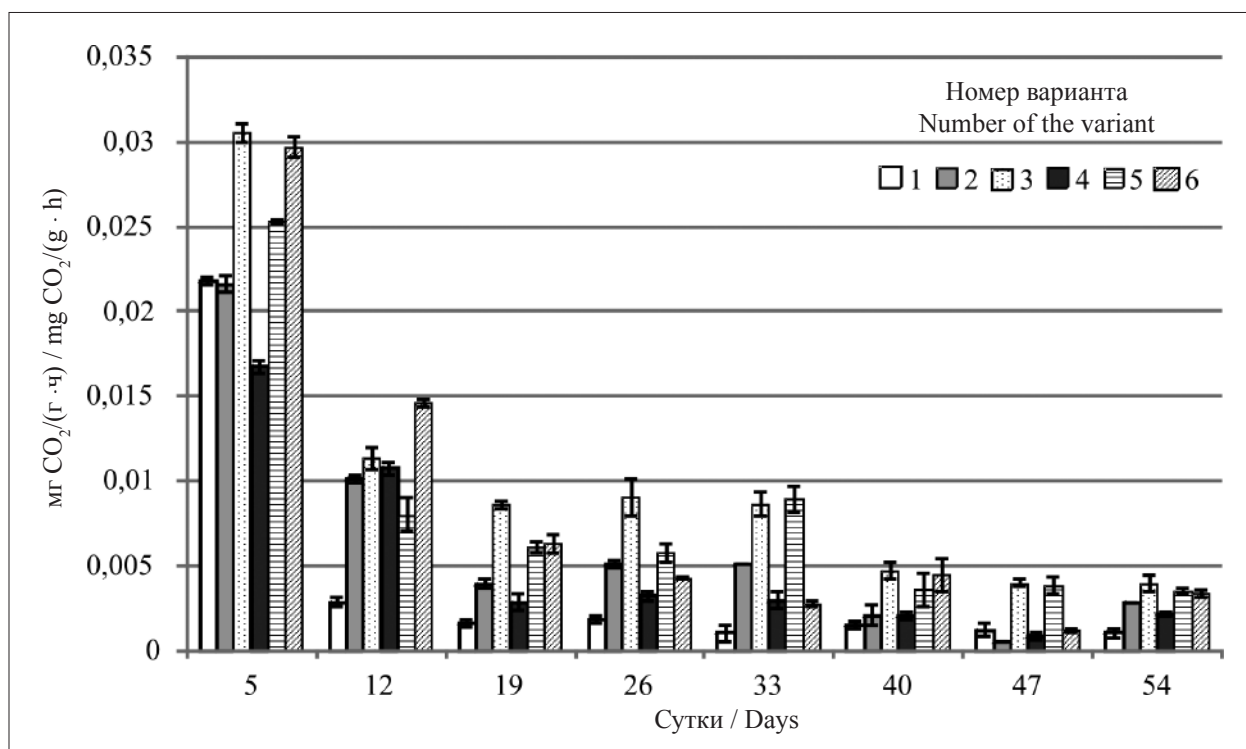


Рис. 4. Интенсивность эмиссии CO₂ / Fig. 4. CO₂ emission rate

составляющей нефти, что способствует выделению в водную фазу большого количества низкомолекулярных фенольных соединений, являющихся продуктами и субстратами исследуемых ферментов. Вещества фенольного типа, как правило, токсичны для растений, что подтверждается максимальной фитотоксичностью почвы в этот период.

При внесении штамма *A. guillouiae* 114 наблюдалась обратная картина, что, возможно, связано с различными путями деградации компонентов нефти этими УОМ [21]. Максимальная активность ферментов приходилась на конец исследования. Внесение в нефтезагрязнённую почву штамма *R. erythropolis* 108 практически не влияло на активность ферментов. Введение консорциума микроорганизмов увеличивало активность пероксидазы и каталазы аналогично действию штамма *A. guillouiae* 112, однако активность полифенолоксидазы увеличивалась лишь к концу эксперимента.

Углекислый газ является конечным продуктом разложения нефти, поэтому по интенсивности дыхания можно судить о процессе восстановления почвы в ходе её очистки [25]. Как видно из рисунка 4, показатель эмиссии CO₂ в незагрязнённой почве в течение всего эксперимента снижался от 0,021 до 0,002 мг CO₂ / (г · ч). Подобная динамика эмис-

сии CO₂, связанная с исчерпанием доступного субстрата, характерна для инкубационных экспериментов [26]. Загрязнение почвы сырой нефтью на протяжении всего эксперимента способствовало повышению уровня дыхания почвы в среднем в 2,5 раза. По-видимому, за счёт увеличения содержания доступного для микробиоценоза органического углерода активизировалась углеводородокисляющая аборигенная микрофлора. Внесение штамма *R. erythropolis* 108 стимулировало эмиссию углекислого газа на 74% относительно загрязнённой нефтью почвы. Высокий уровень эмиссии CO₂ отмечали при внесении в почву штамма *A. guillouiae* 114 и консорциума УОМ. Внесение штамма *A. guillouiae* 112, напротив, способствовало подавлению эмиссии CO₂ относительно загрязнённой нефтью почвы (рис. 4). При этом подавление эмиссии по времени совпадало с периодом высокой фитотоксичности.

Заключение

Инокуляция нефтезагрязнённой почвы ризосферными штаммами УОМ приводит к изменению её биологических свойств, по сравнению с неинокулированной почвой [27]. Согласно полученным результатам, при внесении штаммов *R. erythropolis* 108, *A. guillouiae* 112, *A. guillouiae* 114 и их консорциума

в нефтезагрязнённой почве, как правило, происходит активация оксидоредуктазных ферментов и повышение эмиссии CO_2 . Это является следствием ускорения разложения нефти, сопровождающегося усилением фитотоксичности почвы. К концу эксперимента большинство показателей возвращается к уровню незагрязнённой почвы, что можно расценивать как успешную ликвидацию нефтяного загрязнения. Соответственно, процессы, которые в природных условиях затягиваются на десятилетия, при использовании выделенных нами штаммов УОМ происходят в течение 2–3 месяцев и приводят к восстановлению основных биологических свойств почвы.

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования (ЦКП) «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (Иркутск, Россия).

Работа выполнена в рамках проекта под № гос. регистрации АААА-А17-117011810099-8.

References

1. Lu L., Yazdi H., Jin S., Zuo Y., Fallgren P.H., Ren Z.J. Enhanced bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil using pilot-scale bioelectrochemical systems // *Hazardous Materials*. 2014. V. 274. P. 8–15. doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.03.060
2. Laffon B., Pasaro E., Valdiglesias V. Effects of exposure to oil spills on human health: updated review // *Toxicology and Environmental Health. Part B*. 2016. V. 19. P. 105–128. doi: 10.1080/10937404.2016.1168730
3. Shulz M., Fleet D.M., Camphuysen K.C., Schulze-Dieckhoff M., Laursen K. Wadden Sea quality status report: oil pollution and seabirds // *Wadden Sea quality status report*. Wilhelmshaven. Germany: Common Wadden Sea Secretariat, TMAP. 2017. P. 1–13.
4. Suleymanov R.R., Shorina T.S. The effect of oil pollution on the dynamics of biochemical processes of ordinary chernozem (Orenburg region) // *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra RAN*. 2012. V. 1. P. 240–243 (in Russian).
5. Tiralerdpanich P., Sonthiphan P., Luepromchai E., Pinyakong O. Potential microbial consortium involved in the biodegradation of diesel, hexadecane and phenanthrene in mangrove sediment explored by metagenomics analysis // *Marine Pollution Bulletin*. 2018. V. 133. P. 595–605. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.06.015
6. Fuentes S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014. V. 11. P. 4781–4794. doi: 10.1007/s00253-014-5684-9
7. Xenia M. Microorganisms metabolism during bioremediation of oil contaminated soils // *Bioremediation & Biodegradation*. 2016. V. 7. P. 1–6.
8. Varjani S.J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons // *Bioresource Technology*. 2017. V. 223. P. 277–286. doi: 10.1016/j.biortech.2016.10.037
9. Koshlaf E., Ball A.S. Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted // *AIMS Microbiology*. 2017. V. 3. P. 25–49. doi: 10.3934/microbiol.2017.1.25
10. Wang J., Shen X., Rey J., Yuan Q., Yan Y. Recent advances in microbial production of aromatic natural products and their derivatives // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018. V. 102. P. 47–61.
11. Reyes-Sosa M.B., Apodaca-Hernandez J.E., Arena-Ortiz Ma.L. Bioprospecting for microbes with potential hydrocarbon remediation activity on the north-west coast of the Yucatan Peninsula, Mexico, using DNA sequencing // *Science of the Total Environment*. 2018. V. 642. P. 1060–1074. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.097
12. Mikolasch A., Omirbekova A., Schumann P., Reinhard A., Sheikhany H., Berzhanova R., Mukasheva T., Schauer F. Enrichment of aliphatic, alicyclic and aromatic acids by oil-degrading bacteria isolated from the rhizosphere of plants growing in oil-contaminated soil from Kazakhstan // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015. V. 9. P. 4071–4084. doi: 10.1007/s00253-014-6320-4
13. Bisht S., Pandey P., Bhargava B., Sharma S., Kumar V., Sharma K.D. Bioremediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology // *Brazilian Journal of Microbiology*. 2015. V. 46. P. 7–21. doi: 10.1590/S1517-838246120131354
14. Granina N.I., Vasilyev M.B. Problema otsenki neftezagryazneniya pochv v Irkutskom regione // *Izvestiya Irkutskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2014. No. 8. P. 67–71 (in Russian).
15. Tretyakova M.S., Belovezhets L.A., Markova Yu.A. Screening bacteria associated with plants by the ability to degrade oil components // *Sistemy. Metody. Tekhnologii*. 2015. No. 4. P. 138–142 (in Russian).
16. Mineev V.G., Sychev V.G., Amelyanchik O.A., Bolysheva T.N., Gomonova N.F., Durymina E.P., Egorov B.C., Egorova E.V., Edemskaya N.L., Karpova E.A., Prizhukova V.G. Workshop on Agrochemistry. Moskva: MGU, 2001. 689 p. (in Russian).
17. Khaziye F.Kh. Soil enzymology methods. Moskva: Nauka, 1990. 192 p. (in Russian).
18. Purtova L.N., Kostenkov N.M. CO_2 emission from soils of natural landscapes in the South of Primorye // *Vestnik KrasGAU*. 2013. V. 10. P. 64–68 (in Russian).
19. Drugov Yu.S., Rodin A.A. Environmental analyzes during oil and oil product spills. Moskva: Binom, 2014. 270 p. (in Russian).
20. Kolesnikov S.I., Kazeev K.Sh., Valkov V.F., Aznaryan D.K., Zharkova M.G. Biodiagnosis of ecological condition of soils contaminated with oil and oil products. Rostov-na-Donu: Rostizdat, 2007. 192 p. (in Russian).
21. Belovezhets L.A., Makarova L.E., Tretyakova M.S., Markova Yu.A., Dudareva L.V., Semenova N.V. Possible ways of destruction of polyaromatic hydrocarbons of oil

by certain types of oil-degrading bacteria isolated from plant endo- and rhizospheres // *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2017. V. 53. No. 1. P. 1–6 (in Russian). doi: 10.7868/S0555109917010068

22. Tretyakova M.S., Belovezhets L.A., Markova Yu.A., Makarova L.E. Investigation of the ability of oil destructive bacteria to reduce the toxic effect of oil on plants // *Agrokhimiya*. 2017. V. 12. P. 56–61 (in Russian). doi: 10.7868/S0002188117120079

23. Loginova T.T. The use of *Acinetobacter* strains for bioremediation of oil-contaminated soils in the territory of the Voronezh region // *Vestnik VGU*. 2011. V. 2. P. 127–133 (in Russian).

24. Zhang X., Liu Z., Trung Luc N., Liang X., Liu L.X. Dynamics of the biological properties of soil and the nutri-

ent release of *Amorpha fruticosa* L. litter in soil polluted by crude oil // *Environmental Science and Pollution Research*. 2015. V. 22. No. 21. P. 16749–16757. doi: 10.1007/s11356-015-4874-z

25. Akhmediyev M.V. Assessment of respiration rate of oil-contaminated soils // *Prikladnaya ekologiya. Urbanistika*. 2014. V. 4. P. 165–176 (in Russian).

26. Blagodatskaya E.V., Semenov M.V., Yakushev A.V. The activity and biomass of soil microorganisms in changing environmental conditions. **Moskva: Tovarishestvo nauchnykh izdaviy KMK**, 2016. 243 p. (in Russian).

27. Novosyolova E.I., Kireeva N.A. Enzymatic activity of soils in conditions of oil pollution and its biodiagnostic significance // *Theoretical and Applied Ecology*. 2009. No. 2. P. 4–12. doi: 10.25750/1995-4301-2009-2-004-012