



КОМПЛЕКСЫ МИКРОМИЦЕТОВ ПРИ БИОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ

Г.Ф. Рафикова*, Т.Ю. Коршунова, Е.В. Кузина

Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, проспект Октября, 69, *Email: rgf07@mail.ru

Резюме

При внесении углеводородокисляющих бактерий в нефтезагрязненную почву наряду с ускоренной деструкцией нефти отмечено увеличение видового разнообразия комплексов микромицетов. При обработке нефтезагрязненной засоленной почвы микробными композициями формировался более специфичный комплекс микромицетов, основу которого составляли галотолерантные виды, устойчивые одновременно и к умеренным концентрациям нефти в среде.

Ключевые слова: комплексы микромицетов, нефтезагрязненная почва, углеводородокисляющие микроорганизмы.

Цитирование: Рафикова Г.Ф., Коршунова Т.Ю., Кузина Е.В. Комплексы микромицетов при биоремедиации нефтезагрязненной почвы // Биомика. 2020. Т.12(3). С. 384-388. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-28

© Авторы

COMPLEXES OF MICROMYCETES IN BIOREMEDIATION OF OIL CONTAMINATED SOIL DURING SALINIZATION USING MICROBIAL COMPOSITIONS

G.F. Rafikova*, T.Yu. Korshunova, E.V. Kuzina

Institute of Biology, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences
69 Prospekt Oktyabrya, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

*Email: rgf07@mail.ru

Resume

When introducing hydrocarbon-oxidizing bacteria into oil-polluted soil, along with accelerated destruction of oil, an increase in the species diversity of micromycete complexes was observed. When treating oil-contaminated saline soil with microbial compositions, a more specific complex of micromycetes was formed, which was based on halotolerant species that were resistant to moderate concentrations of oil in the medium at the same time.

Keywords: complexes of micromycetes, oil-contaminated soil, hydrocarbon-oxidizing microorganisms.

Citation: Rafikova G.F., Korshunova T.Yu., Kuzina E.V. Complexes of micromycetes in bioremediation of oil contaminated soil during salinization using microbial compositions. *Biomics*. 2020. V. 12(3). P. 384-388. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-28 (In Russian)

© The Authors

Нефть и нефтепродукты признаны одними из наиболее распространенных загрязнителей окружающей среды. Нефть, попадая в почву, приводит не только к ухудшению ее водного режима и физико-химических свойств, но и к изменению почвенного микробоценоза, тем самым оказывая влияние на процессы трансформации веществ в почве.

Для очистки почвы от нефти используют различные приемы, среди которых наиболее перспективным считается биологический метод с использованием микроорганизмов-нефтереструкторов. Поскольку одновременно с нефтезагрязнением зачастую происходит засоление грунта в результате утечек высокоминерализованных промышленных вод,

немаловажным является использование в таких условиях галотолерантных углеводородокисляющих микроорганизмов [1-4]. О глубине происходящих в нефтезагрязненной и рекультивируемой почве микробных перестроек можно судить по показателям численности и видового состава почвенных микроскопических грибов. При этом характер изменений структуры почвенной микобиоты при загрязнении нефтью и биорекультивации может различаться в зависимости от природы применяемого биопрепарата.

Целью настоящего исследования являлась оценка влияния микроорганизмов-нефтедеструкторов (в том числе галотолерантных) на динамику численности и видовой состав микроскопических грибов нефтезагрязненного выщелоченного чернозема.

Исследования проводили в условиях модельного эксперимента с выщелоченным черноземом ($N_{\text{общ.}} - 0.61\%$, гумус – 10.46%). Для этого воздушно-сухую почву массой 3 кг помещали в вегетационные сосуды и увлажняли до 60% от полной влагоемкости. Для оптимизации водно-воздушного режима почвы использовали дренаж, в течение опыта поддерживали влажность почвы и проводили ее регулярное рыхление. В опытные варианты вносили нефть в концентрации 5% от веса почвы и 50 мл жидкой. Для обработки почвы использовали штаммы углеводородокисляющих бактерий (УОБ) из коллекции микроорганизмов Уфимского Института биологии УФИЦ РАН и ООО «Биохим-Реагент». В опыте использовали отдельные культуры галотолерантных УОБ: *Pseudomonas hunanensis* BCHR-IB-C7 (ВКМ В-3229D), *Yarrowia lipolytica*

BCHR-IB-U2 (ВКПМ У-4382), *Mangrovibacter* sp. BCHR-IB-L3 (ВКМ В-3230D); а также композиции УОБ: композиция 1 - *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ - 5.1/1 (ВКМ В-2753D), *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 (ВКМ В-2754D), *Pseudomonas* sp. ИБ-1.1 (ВКМ В-28361D), *Y. lipolytica* BCHR-IB-U2; композиция 2 - *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ - 5.1/1 (ВКМ В-2753D), *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 (ВКМ В-2754D), *Y. lipolytica* BCHR-IB-U2; композиция 3 - *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ - 5.1/1 (ВКМ В-2753D), *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 (ВКМ В-2754D), *P. hunanensis* BCHR-IB-C7 (ВКМ В-3229D); композиция 4 - *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ - 5.1/1 (ВКМ В-2753D), *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 (ВКМ В-2754D), *Mangrovibacter* sp. BCHR-IB-L3; композиция 5 - *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ - 5.1/1 (ВКМ В-2753D), *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2 (ВКМ В-2754D).

Изучение динамики численности УОБ в почве показало, что все внесенные штаммы микроорганизмов смогли адаптироваться к условиям нефтяного загрязнения и их численность оставалась на относительно высоком уровне в течение всего эксперимента. Наибольшая плотность популяции УОБ наблюдалась в первые 30 суток после постановки эксперимента и в вариантах с внесением микробных композиций составляла в среднем 5×10^7 КОЕ/г, тогда как в контроле была на порядок ниже. Уровень разложения углеводов в почве в целом коррелировал с численностью УОБ. Так, максимальных значений степень деструкции углеводородного субстрата достигала в вариантах с внесением композиций 1, 3, 4, 5 и составляла 32-44% к концу опыта (через 60 суток) против 11.7% в контроле.

Таблица.

Динамика численности микромицетов в выщелоченном черноземе при загрязнении нефтью и внесении микроорганизмов-нефтедеструкторов, 10^5 КОЕ/г
Table - Dynamics of the number of micromycetes in leached Chernozem during oil contamination and introduction of oil-destroying microorganisms, 10^5 CFU / g

Варианты Variants	Сроки отбора образцов The timing of the sampling	
	30 суток	60 суток
Контроль / Control	1.5±0.06	1.2±0.06
НФ (нефтезагрязненная почва) / oil-contaminated soil	5.0±0.21	2.5±0.10
НФ + NaCl + <i>Yarrowia lipolytica</i> BCHR-IB-U2	0.7±0.03	0.3±0.01
НФ + <i>Yarrowia lipolytica</i> BCHR-IB-U2	2.1±0.10	2.0±0.1
НФ + NaCl + <i>Pseudomonas hunanensis</i> BCHR-IB-C7	2.2±0.11	0.6±0.04
НФ + <i>Pseudomonas hunanensis</i> BCHR-IB-C7	2.0±0.11	2.5±0.12
НФ + NaCl + <i>Mangrovibacter</i> sp. BCHR-IB-L3	0.3±0.01	0.4±0.02
НФ + <i>Mangrovibacter</i> sp. BCHR-IB-L3	0.6±0.02	1.6±0.07
НФ + Композиция 1 / Composition 1	2.0±0.10	2.5±0.12
НФ + Композиция 2 / Composition 2	2.5±0.11	1.5±0.07
НФ + Композиция 3 / Composition 3	3.0±0.13	2.8±0.12
НФ + Композиция 4 / Composition 4	4.2±0.18	3.2±0.15
НФ + Композиция 5 / Composition 5	4.0±0.18	1.0±0.05

Загрязнение выщелоченного чернозема нефтью стимулировало развитие грибов (табл.), что, вероятно, связано с тем, что углеводороды нефти в умеренной концентрации (5%) не оказывают столь выраженного токсического эффекта и используются данной группой микроорганизмов в качестве субстрата. Использование УОБ для биоремедиации способствовало незначительному уменьшению этого показателя по сравнению с контролем, очевидно, за счет ускоренного разложения углеводородов нефти в почве и быстрого истощения источника углерода и энергии, доступного для микромицетов. Через 60 суток после постановки эксперимента в некоторых опытных вариантах наблюдалось незначительное увеличение доли грибов, возможно за счет использования ими в качестве субстрата погибших клеток УОБ. В целом, в течение эксперимента в вариантах с внесением УОБ не было отмечено резкого колебания численности микроскопических грибов.

Из исследованных образцов выщелоченного чернозема было выделено 16 видов микромицетов, относящихся к родам *Aspergillus*, *Microdochium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Trichoderma*. В выщелоченном черноземе преобладали грибы из родов *Aspergillus* и *Penicillium*. В незагрязненной почве и опытных вариантах доминировал, главным образом, вид *Penicillium glabrum*. Внесение нефти в выщелоченный чернозем приводило к появлению таких видов как *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium lanosum* и *Talaromyces variabilis*, не присутствовавших

ранее в незагрязненной фоновой почве. Загрязнение почвы нефтью обуславливало изменение структуры комплекса микромицетов за счет перехода большинства типичных видов в ранг случайных. Аналогичные тенденции были отмечены и другими исследователями при изучении воздействия загрязнения выбросами предприятий цветной металлургии на комплексы почвенных микромицетов [5, 6]. При обработке почвы жидкой культурой микроорганизмов-нефтедеструкторов в целом наблюдалось увеличение видового разнообразия грибов при сохранении типичных видов, характерных для фоновой почвы.

Совместное воздействие нефти и засоления значительно изменяло видовой состав микромицетов и приводило к формированию более специфичного комплекса. В загрязненных почвенных образцах, обработанных культурами галотолерантных УОБ, и с дополнительным внесением NaCl элиминировался вид *Penicillium glabrum*, очевидно, в силу его чувствительности к повышенной концентрации соли. При этом доминирующее положение занимали другие виды, вероятно, более толерантные к засолению – *Penicillium expansum*, *P. decumbens*, *P. velutinum*, что согласуется с данными других исследователей, выделявших некоторые из этих видов из мест природного засоления [7, 8]. В целом, в данных вариантах эксперимента отмечалась тенденция снижения числа видов и изменения видового разнообразия почвенных микромицетов.

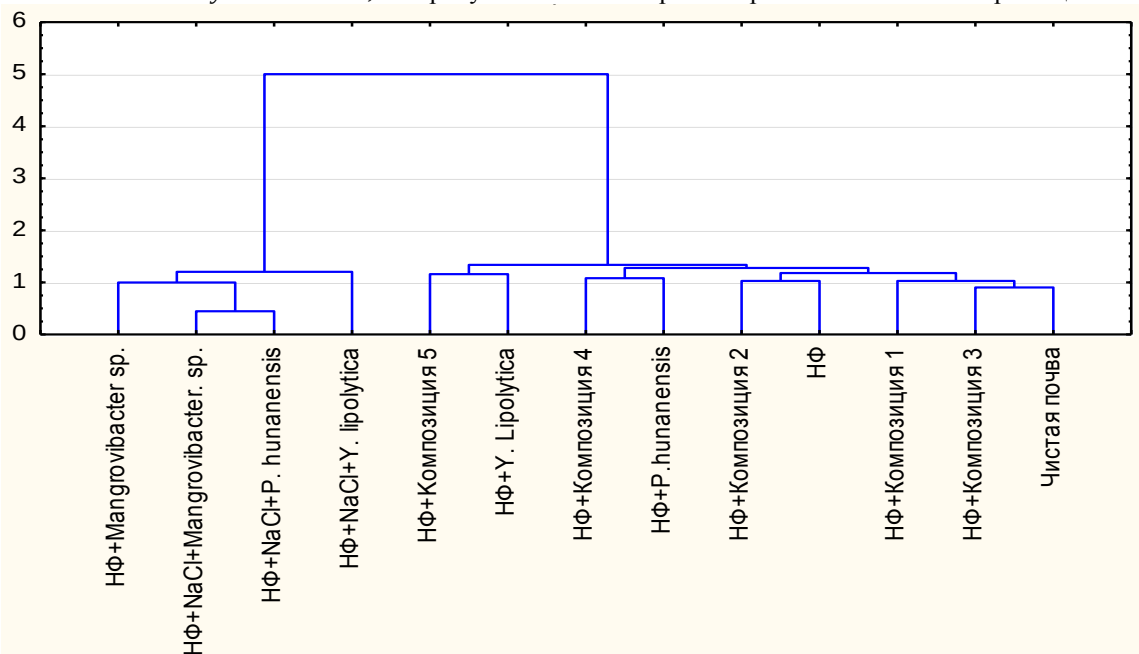


Рис. Сходство видового состава комплексов микромицетов различных вариантов эксперимента с контролем: НФ- нефтезагрязненная почва. По оси абсцисс – варианты эксперимента. Евклидово расстояние, метод Варда.
Fig. Similarity of the species composition of micromycete complexes of various experimental variants with the control: NF-oil-contaminated soil. On the abscissa axis-experimental variants. Euclidean distance, ward's method.

В результате кластерного анализа, проведенного по показателю видового сходства, было получено распределение микромицетов по двум группам в нефтезагрязненной почве при внесении УОБ в качестве рекультивирующего агента (рис.). Первую группу составили, главным образом, все варианты эксперимента с внесением NaCl. Это позволяет говорить о том, что наибольшее влияние на почвенную микобиоту оказывало засоление на фоне нефтяного загрязнения. При этом внесение галотолерантных штаммов УОБ не смогло привести к восстановлению исходного состава почвенной микобиоты. Во вторую группу вошли опытные варианты более сходные с контролем по видовому составу микромицетов. Внесение в нефтезагрязненную почву тех же штаммов бактерий-нефтедеструкторов, что и в засоленные почвенные образцы, приводило к формированию микобиоты более сходной с таковой контрольного варианта. Максимальное сходство с микобиотой контроля обнаруживалось в вариантах с применением Композиции 3 и Композиции 1 – они составляли отдельный кластер с незагрязненной почвой.

Таким образом, нефтяное загрязнение совместно с засолением оказывало большее влияние на видовой состав грибов выщелоченного чернозема, чем внесение в почву только нефти. В обработанных УОБ вариантах с засолением на фоне загрязнения формировался более специфичный комплекс микромицетов, основу которого составляли галотолерантные виды, устойчивые одновременно и к умеренным концентрациям нефти в среде. Применение углеводородокисляющих штаммов микроорганизмов для рекультивации почвы, подверженной воздействию нефти, изменяло структуру почвенной микобиоты при незначительном влиянии на численность грибов. Внесение УОБ в нефтезагрязненную почву приводило к увеличению видового разнообразия комплексов микромицетов при сохранении типичных видов, характерных для фоновой почвы; ускоренному разложению углеводородов нефти. Применение Композиции 1 и Композиции 3 для рекультивации нефтезагрязненного выщелоченного чернозема наряду с перечисленными положительными эффектами способствовало формированию комплексов микромицетов сходных с фоновыми. Композиция 1, состоящая из микроорганизмов *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ - 5.1/1, *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2, *Pseudomonas* sp. ИБ-1.1, *Y. lipolytica* ВСНР-ИБ-U2, и Композиция 3, в состав которой входят штаммы бактерий *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ - 5.1/1, *Ochrobactrum* sp. ИБ ДТ-5.3/2, *P. humanensis* ВСНР-ИБ-C7, могут быть успешно использованы в качестве основы биопрепарата-нефтедеструктора.

Работа выполнена в рамках ГЗ УФИЦ РАН (№ 075-00326-19-00) по теме № АААА-А18-118022190100-9 на базе УИБ УФИЦ РАН и при поддержке гранта РФФИ № 18-29-05025/18 с использованием оборудования ЦКП «Агидель» (Уфа, Россия).

Литература

1. Borzenkov I.A., Milekhina E.I., Gotoeva M.T., Rozanova E.P., Belyaev S.S. The properties of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from the oilfields of Tatarstan, western Siberia, and Vietnam // Microbiology. 2006. Vol. 75, N 1. P. 66-72. DOI: 10.1134/S0026261706010127
2. Плотникова Е.Г., Ястребова О.В., Ананьина Л.Н., Дорофеева Л.В., Лысанская В.Я., Демаков В.А. Галотолерантные бактерии рода *Arthrobacter* - деструкторы полициклических ароматических углеводородов // Экология. 2011. № 6. С. 459-466.
3. Kumar M., Leon V., De Sisto Materano A., Ilzins O.A., Luis L. Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp. // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2008. V. 24. P. 1047-1057. DOI: 10.1007/s11274-007-9574-5
4. Varjania S.J., Rana D.P., Jain A.K., Bateja S., Upsani V.N. Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India // International Biodeterioration and Biodegradation. 2015. V. 103. P. 116-124. DOI: 10.1016/j.ibiod.2015.03.030
5. Евдокимова Г.А., Корнейкова М.В., Лебедева Е.В. Сообщества микромицетов в почвах в зоне воздействия алюминиевого завода // Микология и фитопатология. 2007. Т. 41, вып.1. С. 20–28.
6. Евдокимова Г.А., Корнейкова М.В., Мозгова Н.П. Изменения свойств почв и почвенной биоты в зоне воздействия азротехногенных выбросов Кандалакшского алюминиевого завода // Почвоведение. 2013. № 10. С. 1274-1280.
7. Gunde-Cimerman N., Frisvad J.C., Zalar P., Plemenitas A. Halotolerant and halophilic fungi // Biodiversity of fungi: their role in human life. New Delhi: India. Oxford et IBH Publishing Co. Pvt. Ltd, 2005. P. 69-127.
8. Смолянюк Е.В., Биланенко Е.Н. Сообщества галотолерантных микромицетов из мест природного засоления // Микология и Фитопатология. 2011. Т. 45, вып. 5. С. 418-426.

References

1. Borzenkov I.A., Milekhina E.I., Gotoeva M.T., Rozanova E.P., Belyaev S.S. The properties of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from the

- oilfields of Tatarstan, western Siberia, and Vietnam // Microbiology. 2006. Vol. 75, N 1. P. 66-72. DOI: 10.1134/S0026261706010127
2. Plotnikova E.G., Jastrebova O.V., Anan'ina L.N., Dorofeeva L.V., Lysanskaja V.Ja., Demakov V.A. Galotolerantnye bakterii roda *Arthrobacter* - destruktory policiklicheskih aromaticeskikh uglevodorodov // Ekologija. 2011. № 6. S. 459-466. [Halotolerant bacteria of the genus *Arthrobacter* - destructors of polycyclic aromatic hydrocarbons] (In Russian)
3. Kumar M., Leon V., De Sisto Materano A., Ilzins O.A., Luis L. Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp. // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2008. V. 24. P. 1047-1057. DOI: 10.1007/s11274-007-9574-5
4. Varjania S.J., Rana D.P., Jain A.K., Bateja S., Upsani V.N. Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India // International Biodeterioration and Biodegradation. 2015. V. 103. P. 116-124. DOI: 10.1016/j.ibiod.2015.03.030
5. Evdokimova G.A., Kornejkova M.V., Lebedeva E.V.) Soobshhestva mikromicetov v pochvah v zone vozdejstvija aljuminievogo zavoda // Mikologija i fitopatologija. 2007. T. 41, vyp.1. S. 20–28. [Communities of micromycetes in soils in the zone of impact of an aluminum plant] (In Russian)
6. Evdokimova G.A., Kornejkova M.V., Mozgova N.P. Izmenenija svojstv pochv i pochvennoj bioty v zone vozdejstvija ajerotehnogennyh vybrosov Kandalakshskogo aljuminievogo zavoda // Pochvovedenie. 2013. № 10. S. 1274-1280. [Changes in soil properties and soil biota in the zone of impact of aerotechnogenic emissions of the Kandalaksha aluminum plant] (In Russian)
7. Gunde-Cimerman N., Frisvad J.C., Zalar P., Plemenitas A. Halotolerant and halophilic fungi // Biodiversity of fungi: their role in human life. New Delhi: India. Oxford et IBH Publishing Co. Pvt. Ltd, 2005. P. 69-127.
8. Smoljanjuk E.V., Bilanenko E.N. Soobshhestva galotolerantnyh mikromicetov iz mest prirodnogo zasolenija // Mikologija i Fitopatologija. 2011. T. 45, vyp. 5. S. 418-426. [Communities of halotolerant micromycetes from places of natural salinity] (In Russian)