

УДК 579.6

DOI: 10.31040/2222-8349-2022-0-3-23-30

**СКРИНИНГ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ,
ОБЛАДАЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ И ХЛОРИДУ НАТРИЯ**

© Т.Ю. Коршунова, Е.В. Кузина, С.Р. Мухаматдьярова, Д.О. Логинов, Ю.Ю. Шарипова

В процессе добычи углеводородного сырья, помимо механического нарушения почвенного покрова, происходит его химическая контаминация углеводородами и тяжелыми металлами, содержащимися в нефти, а также нефтепромысловыми сточными водами, в основном хлоридно-натриевого состава. Комбинированное загрязнение оказывает более выраженное неблагоприятное воздействие на растения и почвенный биоценоз, чем каждый поллютант по отдельности, и приводит к очень быстрой потере плодородия почвы. Целью настоящей работы был скрининг новых штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов, устойчивых к воздействию повышенных концентраций хлорида натрия и тяжелых металлов. Выделение изолятов микроорганизмов из образцов техногенно загрязненных почв с территории Республики Башкортостан осуществляли методом накопительных культур на жидкой минеральной среде Раймонда с нефтью. Углеводородокисляющую активность бактерий определяли по степени деструкции алифатической фракции нефти газохроматографическим методом после экстракции гексаном. Устойчивость микроорганизмов к присутствию хлорида натрия и тяжелых металлов (Zn, Co, Cd, Cu, Pb, Ni) устанавливали по их росту на мясо-пептонном агаре с различными концентрациями NaCl или солями этих металлов. Из 14 выделенных изолятов были отобраны 6, наиболее активно растущих на твердой среде с нефтью. Самая высокая численность и самая значительная углеводородокисляющая активность при культивировании в жидкой среде с нефтью обнаружена у изолята 22 (степень биодеструкции нефти составила 93.0%). Все микроорганизмы являлись галотолерантными и росли при 5 и 7%-м содержании хлорида натрия в среде, но наиболее устойчивыми к засолению оказались культуры 11 и 41, которые выдерживали концентрацию NaCl в 10%. Наибольшей резистентностью к действию металлов обладали изоляты 33.1 и 33.2. Наименее токсичными для микроорганизмов были свинец и цинк. Полученные результаты следует считать предварительными, а сами изоляты нуждаются в дальнейшем исследовании с целью их возможного применения в экобиотехнологии.

Ключевые слова: биоремедиация, бактерии-нефтедеструкторы, засоление, тяжелые металлы, углеводородокисляющая активность.

Нарастающие темпы добычи нефти и широкомасштабное использование продуктов ее переработки приводят к глобальному загрязнению окружающей среды. Особенно сильно страдает почвенный покров, в который попадают не только углеводороды, но и извлекаемые одновременно с нефтью высокоминерализованные пластовые воды. Значительная часть их солевого компонента приходится на хлориды [1],

особенно на хлорид натрия [2]. Наличие большого количества данных соединений приводит к появлению техногенно засоленных почв, водно-физические условия которых становятся крайне неблагоприятными для роста и развития растений и почвенных организмов [3]. Кроме того, в настоящее время месторождения легких нефтей, по большей части, истощены, и в разработку включаются трудноизвлекаемые запасы

КОРШУНОВА Татьяна Юрьевна – д.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,

e-mail: korshunovaty@mail.ru

КУЗИНА Елена Витальевна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,

e-mail: misshalen@mail.ru

МУХАМАТДЬЯРОВА Светлана Ринатовна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,

e-mail: svetrm@gmail.com

ЛОГИНОВ Даниил Олегович, Уфимский государственный нефтяной технический университет,

e-mail: Daniloginov@bmch.su

ШАРИПОВА Юлияна Юпитеровна, Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,

e-mail: gerda.666_09@mail.ru

с высокой плотностью, обогащенные токсичными элементами [4]. Это увеличивает экологические риски при освоении углеводородного сырья, приводя к контаминации земель, в том числе тяжелыми металлами. Обладая канцерогенным и мутагенным эффектом, они являются генотоксикантами [5], несмотря на то, что как микроэлементы имеют большое значение для существования различных организмов. В условиях засоления одновременное присутствие нефти и тяжелых металлов оказывает более сильное негативное воздействие на растения и почвенный биоценоз [6], чем каждый из поллютантов по отдельности, что значительно затрудняет очистку таких территорий.

Наиболее экологически и экономически целесообразным методом восстановления нарушенных почв и грунтов является биоремедиация [7], основанная на использовании деградиационного потенциала живых объектов, в частности, микроорганизмов. При этом они как агенты биодеструкции должны обладать не только способностью к разложению поллютантов, но и стабильно поддерживать свою численность и функциональную активность при наличии дополнительных негативных факторов среды, таких как экстремальные значения температуры, влажности, pH, избыточная концентрация солей и пр. [8, 9].

Принимая во внимание все вышеизложенное, целью настоящей работы было выделение новых штаммов углеводородоксилирующих микроорганизмов, устойчивых к воздействию повышенных концентраций хлорида натрия и тяжелых металлов и способных к росту в широком диапазоне температуры.

Объекты и методы исследования. Выделение изолятов микроорганизмов из образцов почвы с территории Республики Башкортостан осуществляли методом накопительных культур [10]. Для этого в колбы со 100 мл жидкой минеральной среды Раймонда [11] с нефтью (1% объем) в качестве единственного источника углерода и энергии добавляли 2 г почвы, а затем инкубировали на лабораторном термостатируемом встряхивателе при температуре 28°C и 160 об./мин в течение 7 суток. Для выделения бактериальных изолятов проводили высев из накопительных культур на мясопептонный агар (МПА) [10], после чего чашки Петри помещали в термостат при 28°C на 5 суток.

В работе использовали нефть Мамонтовского месторождения (Нефтеюганский район, ХМАО – Югра). Характеристики нефти: плотность – 0.871–0.885 г/см³, содержание серы – 1.2–1.5%, парафина – 2.9–3.8, смол – 7.6–9.1, асфальтенов – 2.2–3.1%.

Чистоту выделенных культур устанавливали общепринятыми методами – микроскопическим контролем и высевом на МПА.

С целью проверки изолятов на способность к росту на твердой среде с нефтью производили посев петлей по радиусу чашки Петри со средой Раймонда от заполненной нефтью лунки в центре агаровой пластинки к периферии чашки. Для дальнейшей работы использовали штаммы, характеризующиеся наиболее интенсивным ростом.

Изучение культуральных особенностей отобранных изолятов микроорганизмов осуществляли с помощью общепринятых руководств [10, 12].

Рост изолятов в жидкой среде с нефтью (1%) оценивали при культивировании на среде Раймонда при температуре 28°C и 160 об./мин на 3 и 6-е сутки инкубирования и по внешнему изменению состояния содержимого колб.

Углеводородоксилирующую активность изолятов определяли по степени деструкции алифатической фракции нефти. В колбы со стерильной средой Раймонда и нефтью в качестве источника углерода (4% вес.) вносили биомассу микроорганизмов, количество которой соответствовало «зеркалу» петли (титр микроорганизмов в колбе был не менее 10⁵ КОЕ/мл). Инкубацию проводили в течение 5 суток при температуре 28°C и 160 об./мин. В качестве контроля использовали колбу, содержащую стерильную среду Раймонда и нефть, но без внесения микроорганизмов. После завершения процесса культивирования нефтепродукты экстрагировали гексаном. Для этого в колбу с культуральной жидкостью вносили 50 мл гексана и встряхивали в течение 1 ч. Затем с помощью делительной воронки отделяли верхний гексановый слой, выдерживали его 12 ч при температуре 2–4°C для выпадения из раствора асфальтенов, после чего отбирали 10 мл очищенного раствора и упаривали на роторном испарителе Rotavapor R-100 (Buchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) досуха. Остаток растворяли в небольшом объеме гексана (1.0–2.0 мл). Полученный гексановый экстракт очищали от полярных соединений на хроматографической колонке

с оксидом алюминия, пропитанным гексаном. В колонку помещали исследуемый образец и после его полного вхождения в наполнитель проводили элюирование гексаном (20.0–25.0 мл). Далее из полученного элюента отгоняли гексан на роторном испарителе. Остаток растворяли в небольшом количестве гексана (0.5–1.0 мл). Деструкцию нефти определяли методом газожидкостной хроматографии с использованием хроматографа «Кристалл Люкс 4000» (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой Zebtron™ ZB-1XT. Режим анализа: начальная температура колонки 100°C, скорость нагрева 5°C/мин, конечная температура 270°C. Газом-носителем служил гелий. Степень биодеструкции нефти (%) рассчитывали на основе хроматографических данных по методу внутренней нормализации в соответствии с инструкциями к прибору.

В опытах по оценке роста микроорганизмов в жидкой среде с нефтью и их способности к окислению углеводов в качестве эталона использовали штамм-нефтедеструктор *Acinetobacter calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 [13].

Устойчивость изолятов к присутствию хлорида натрия и тяжелых металлов (Zn, Co, Cd, Cu, Pb, Ni) определяли по их росту на среде МПА с NaCl (1, 3, 5, 7, 8, 9, 10%) или солями этих металлов ($ZnSO_4 \times 6H_2O$, $CoCl_2 \times 2H_2O$, $Cd(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$, $CuSO_4 \times 5H_2O$, $Pb(CH_3COO)_2 \times 3H_2O$, $NiCl_2 \times 6H_2O$) после инкубации в течение 7 суток при температуре 28°C. Концентрацию ионов металлов варьировали в диапазоне 0.25–1.50 г/л. Контролем служила

среда МПА. Учет результатов осуществляли визуально, сравнивая рост изолятов в контрольном и опытных вариантах.

Способность микроорганизмов к росту в широком диапазоне температур выявляли после инкубации на МПА в течение 7 суток при 4 и 41°C.

Статистическую обработку осуществляли с применением стандартных программ MS Excel. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Для оценки достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента ($p \leq 0.05$).

Результаты и их обсуждение. Из 14 визуально различающихся при выращивании на МПА изолятов для дальнейших исследований были отобраны 6 культур, обозначенные как 11, 22, 33.1, 33.2, 41 и 53, которые характеризовались наиболее интенсивным ростом на агаризованной среде Раймонда с нефтью. Источники выделения изолятов и описание внешнего вида их колоний при росте на МПА приведены в табл. 1.

На первых этапах исследования нефтеокисляющую активность микроорганизмов можно наглядно оценить по изменению цвета и мутности культуральной жидкости, появлению хлопьев, мелких гранул, а также диспергированию нефти. Кроме того, к числу важных характеристик, которыми должен обладать штамм-деструктор поллютантов, относится такое свойство, как поддержание значительной плотности своей популяции на протяжении процесса деградации.

Таблица 1

Источник выделения и культуральные свойства изолятов

Изолят	Источник выделения	Внешний вид колоний
11	РБ, Гафурийский р-н, почва с берега р. Усолка	Круглые колонии диаметром 3 мм, кораллового цвета с ровным краем и гладкой поверхностью
22	РБ, г. Уфа, урбанозем (почва с территории промышленного предприятия)	Круглые колонии диаметром 6 мм, молочного цвета с ровным краем и гладкой поверхностью
33.1	РБ, г. Уфа, урбанозем (почва рядом с проезжей частью улицы)	Круглые выпуклые колонии диаметром 4 мм, темно-кремового цвета с ровным краем и гладкой поверхностью слизистой консистенции
33.2	РБ, г. Уфа, урбанозем (почва рядом с проезжей частью улицы)	Круглые выпуклые колонии диаметром 1 мм, темно-кремового цвета с волнистым краем и гладкой поверхностью плотной консистенции
41	РБ, Хайбуллинский р-н, отвал Бурибаевского ГОК	Круглые колонии диаметром 4 мм, горчичного цвета с ровным краем и гладкой поверхностью
53	РБ, Баймакский р-н, карьер рудника Кульбуртау	Круглые колонии диаметром 4 мм, персикового цвета с ровным краем и гладкой поверхностью

Характеристика роста культур микроорганизмов в жидкой среде с нефтью

Изолят	Титр, $\times 10^6$ КОЕ/мл		Состояние среды
	3 сут	6 сут	
11	2.3 \pm 0.2	0.5 \pm 0.1	Помутнение среды, диспергирование нефти, образование хлопьев
22	340.0 \pm 13.1	360.0 \pm 11.2	Помутнение среды, диспергирование нефти, образование хлопьев
33.1	0.9 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	Помутнение среды, диспергирование нефти, образование хлопьев
33.2	0.1 \pm 0.01	0.5 \pm 0.1	Помутнение среды, диспергирование нефти, образование хлопьев
41	6.7 \pm 0.4	1.0 \pm 0.1	Помутнение среды, нефтяная пленка на поверхности среды и на стенках колбы
53	1.2 \pm 0.1	0.1 \pm 0.01	Помутнение среды, нефтяная пленка на поверхности среды и на стенках колбы
<i>A. calcoaceticus</i> ИБ ДТ-5.1/1	100.0 \pm 4.3	98.0 \pm 5.1	Помутнение среды, диспергирование нефти, образование хлопьев

Примечание. Начальный титр микроорганизмов составлял $2-3 \times 10^3$ КОЕ/мл.

Среди отобранных изолятов культура 22 продемонстрировала самую высокую способность к росту в жидкой среде с нефтью. Уже на 3 сутки культивирования ее численность составила 3.4×10^8 КОЕ/мл и сохранялась на том же уровне в дальнейшем (табл. 2). Это более чем в 3 раза превышало указанный показатель у эталонного штамма углеводородокисляющих микроорганизмов *Acinetobacter calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1, входящего в состав биопрепарата-нефтедеструктора «Ленойл»®. При этом визуально наблюдались явные признаки разложения нефти – помутнение среды, эмульгирование нефтяной пленки и появление хлопьев.

В колбах с культуральной жидкостью изолятов 33.1 и 33.2 также присутствовали признаки эмульгирования нефти. Эти микроорганизмы оказались способны к поддержанию своей численности на стабильном уровне, хотя плотность их популяции была в сотни раз ниже, чем у изолята 22 (табл. 2).

Подсчет количества микроорганизмов изолятов 11, 41 и 53 свидетельствовал о том, что к концу эксперимента оно стало меньше, чем на третьи сутки культивирования. Одновременно с этим в колбах с культурами 41 и 53 обнаруживалась нефтяная пленка на поверхности среды и стенках сосуда, что говорит о неполном разложении субстрата. В колбе со изолятом 11 присутствовали все три анализируемых внешних признака деградации нефти (табл. 2).

Углеводородокисляющую активность микроорганизмов оценивали по убыли алифатической фракции нефти. Принимая во внимание данные о способности изолятов к росту в жидкой среде с нефтью (табл. 2), оценку углеводородокисляющей активности провели только у наиболее перспективных культур 11, 22, 33.1, 33.2, которые продемонстрировали разную степень деструкции нефти (рис.). Самая низкая наблюдалась в варианте со изолятом 33.1 (4.2%), а самая высокая (93.0%) – со изолятом 22, у которого этот показатель был выше, чем у эталонного штамма *Acinetobacter calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 (73.3%).

Температура окружающей среды является одним из экологических параметров, влияющих на жизнедеятельность и популяционную динамику микроорганизмов [8, 9]. Последний фактор очень важен для эффективного протекания процесса биоремедиации. Кроме того, от температуры зависит растворимость гидрофобных углеводородов, а значит, и их биодоступность для бактерий-деструкторов. Поэтому широкий температурный диапазон является несомненным преимуществом при выборе микроорганизмов для применения в экобиотехнологии. В настоящем исследовании при 4°C лишь изолят 41 обладал умеренным ростом, у остальных бактерий он оказался слабым или вообще отсутствовал (табл. 3). При повышенной температуре (41°C) у большей части микроорганизмов рост был выражен незначительно, только изоляты 11 и 41 демонстрировали его обилие.

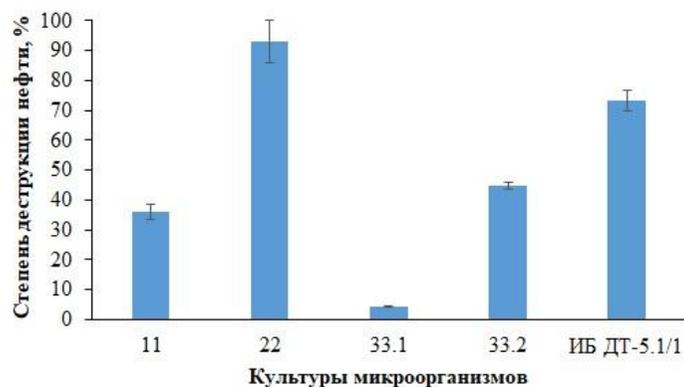


Рис. Степень деструкции нефти культурами микроорганизмов

Засоленные экосистемы широко распространены в природе, что связано как с геолого-климатическими, так и с антропогенными факторами (орошение, контаминация нефтепромышленными сточными водами и пр.) [3]. Использование микроорганизмов, способных разлагать органические поллютанты при наличии высокой минерализации, позволяет избежать необходимости предварительного снижения концентрации солей на загрязненном участке (путем разбавления, обратного осмоса, ионного обмена и др.) до биологической обработки [14]. Все изученные нами изоляты показали хороший или очень хороший рост при 1–5% содержании хлорида натрия в среде, но наиболее устойчивыми к условиям засоления оказались культуры 11 и 41, которые выдерживали 10% NaCl (табл. 3).

Среди большого числа поллютантов особо следует выделить тяжелые металлы, загрязнение которыми является глобальной проблемой из-за их длительного периода полураспада и стойкости в окружающей среде. Появление в почве данных

токсикантов может быть связано с естественным выветриванием материнской породы, однако в основном это происходит в результате нарушения экологических норм в процессе производственной деятельности человека [15]. Очень часто возникает совместное загрязнение тяжелыми металлами и нефтью, что делает восстановление почвы весьма затруднительным [16]. Особый интерес для очистки таких территорий представляют штаммы бактерий, одновременно обладающие углеводородокисляющей активностью и устойчивостью к повышенным концентрациям тяжелых металлов в среде [17].

Согласно [18], свинец, кадмий и цинк относятся к 1 классу опасности (вещества высокоопасные). Все изучаемые изоляты оказались не способны к росту при наличии в среде цинка и кадмия в концентрации выше 0.25 г/л (за исключением культуры 33.1, которая росла при содержании Zn^{2+} в количестве 0.5 г/л), при этом они проявили устойчивость к ионам свинца в концентрации 1.00–1.25 г/л (табл. 3).

Таблица 3

Рост изолятов при различных условиях среды

Изолят	Температура, °C		Максимальная концентрация NaCl, %	Максимальное содержание тяжелых металлов, г/л					
	4	41		Pb ²⁺	Ni ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Co ²⁺	Cd ²⁺
11	–	++++	10	1.00	<0.25	<0.25	0.25	<0.25	<0.25
22	+	+	5	1.00	<0.25	<0.25	0.25	<0.25	<0.25
33.1	+	+	7	1.00	0.25	0.25	0.50	0.25	0.25
33.2	+	+	7	1.25	0.25	0.25	0.25	0.50	0.25
41	++	++++	10	1.00	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
53	–	+	7	1.25	<0.25	0.25	0.25	0.25	<0.25

Примечания: +++++ обильный рост; +++ хороший рост; ++ умеренный рост; + слабый рост; – отсутствие роста.

Что касается никеля, меди и кобальта, отнесенных ко 2 классу опасности (вещества умеренно опасные), то рост всех микроорганизмов происходил только в том случае, если их концентрация не превышала 0.25 г/л (за исключением культуры 33.2, которая росла в присутствии Co^{2+} в количестве 0.5 г/л (рис.)).

Таким образом, из 14 изолятов микроорганизмов, выделенных из образцов техногенно загрязненных почв с территории Республики Башкортостан, были отобраны 6, наиболее активно растущих на твердой питательной среде с нефтью в качестве единственного источника углерода и энергии. Самой высокой численностью и самой значительной углеродородокисляющей активностью при культивировании в жидкой среде с нефтью обладал изолят 22. Установлено, что только изолят 41 был способен к росту в широком диапазоне температуры (4–41°C). При этом все изученные микроорганизмы являлись галотолерантными и росли при 5 и 7%-м содержании хлорида натрия в среде, но наиболее устойчивыми к засолению оказались культуры 11 и 41, растущие в присутствии 10% NaCl. Наименее токсичными для микроорганизмов были свинец и цинк, а наибольшей резистентностью к действию всех исследованных металлов (Zn, Co, Cd, Cu, Pb, Ni) обладали изоляты микроорганизмов 33.1 и 33.2.

Представленные выводы можно рассматривать только как предварительные. На данном этапе работы представляется затруднительным выделить какой-либо изолят или их группу в качестве наиболее перспективных для биоремедиации нефтезагрязненных земель в условиях сопутствующей контаминации хлоридами и солями тяжелых металлов. Для составления рекомендаций по дальнейшему использованию выделенных изолятов необходимо продолжить исследования зависимости их нефтеразлагающей активности от высоких концентраций указанных поллютантов.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России по теме №122031100163-4 и при частичной финансовой поддержке стратегического проекта «Технологии декарбонизации» Программы Приоритет-2030 УГНТУ (Б10 «Разработка биотехнологий рекультивации комплексно загрязненных почв в различных почвенно-климатических условиях»).

Литература

1. Полякова Н.В., Задорожный П.А., Трухин И.С., Суховерхов С.В., Маркин А.Н., Авраменко В.А., Бриков А.В. Определение химического состава попутно добываемых пластовых, морских вод и отложений солей из нефтепромысловых систем платформы «Моликпак» // Нефтяное хозяйство. 2018. № 4. DOI: 10.24887/0028-2448-2018-4-43-47
2. Сангаджиева Л.Х., Самтанова Д.Э. Химический состав пластовых вод и их влияние на загрязнение почвы // Геология, география и глобальная энергия. 2013. № 3(50). С. 168–178.
3. Иванищев В.В., Евграфкина Т.Н., Бойкова О.И., Жуков Н.Н. Засоление почвы и его влияние на растения // Известия ТулГУ. Науки о Земле. 2020. № 3. С. 28–42.
4. Ященко И.Г. Тяжелые ванадиевые носители нефти России // Известия ТПУ. 2012. Т. 321. № 1. С. 105–111.
5. Горбов С.Н., Безуглова О.С., Вардуни Т.В., Горовцов А.В., Тагиведиев С.С., Гильдебрант Ю.А. Генотоксичность и загрязнение тяжелыми металлами естественных и антропогенно-преобразованных почв Ростова-на-Дону // Почвоведение. 2015. Т. 48. № 12. С. 1519–1529.
6. Jampasri K., Saeng-ngam S. Phytoremediation of heavy metal and total petroleum hydrocarbon co-contaminated soil under salinity condition // SWU Sci. J. 2017. V. 33. № 2. P. 229–246.
7. Sui X., Wang X., Li Y., Ji H. Remediation of petroleum-contaminated soils with microbial and microbial combined methods: advances, mechanisms, and challenges // Sustainability. 2021. V. 13: 9267. DOI:10.3390/su13169267
8. Чернявская М.И., Букляревич А.А., Делеган Я.А., Охремчук А.Э., Филонов А.Е., Титок М.А. Биоразнообразие почвенных углеродородокисляющих бактерий из разных климатических зон // Микробиология. 2018. Т. 87. № 5. С. 581–594.
9. Gupta A., Gupta R., Singh R.L. Microbes and environment // Principles and applications of environmental biotechnology for a sustainable future, applied environmental science and engineering for a sustainable future / Ed. by R.L. Singh. Springer Science, Business Media, Singapore, 2017. P. 43–84.
10. Практикум по микробиологии / под ред. А.И. Нетрусова. М.: Академия, 2005. 602 с.
11. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // Develop. Industr. Microbiol. 1961. V. 2. № 1. P. 23–32.
12. Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н., Лысак Л.В. Методы идентификации и выделения почвенных бактерий. М.: Изд-во МГУ, 1990. 76 с.
13. Коршунова Т.Ю., Мухаматдырова С.Р., Логинов О.Н. Окисление бактериями *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 нефти и нефтяных углеводородов // Известия Уфимского научного центра РАН. 2013. № 3. С. 16–18.

14. Ветрова А.А., Иванова А.А., Филонов А.Е., Забелин В.А., Нечаева И.А., Нгуэт Ле Тхи Бич, Боронин А.М. Сравнительная эффективность деградации нефтепродуктов консорциумом плазмидоносителей штаммов-деструкторов и биопрепаратами «МикроБак» и «Биоойл» // Известия ТулГУ. Естественные науки. 2013. Вып. 2(1). С. 258–272.

15. Masindi V., Muedi K.L. Environmental contamination by heavy metals // Heavy Metals / Ed. by H.E.M. Saleh, R.F. Aglan. IntechOpen, London, 2018. P. 115–132.

16. Cheng J., Sun Z., Yu Y., Li X., Li T. Effects of modified carbon black nanoparticles on plant-microbe remediation of petroleum and heavy metal co-contaminated soils // Int. J. Phytoremed. 2019. V. 21. № 7. P. 634–642.

17. Giwa O.E., Ibitoye F.O. Bioremediation of heavy metal in crude oil contaminated soil using isolated Indigenous microorganism cultured with *E. coli* DE3 BL21 // Int. J. Engin. Appl. Sci. 2017. V. 4. № 6. P. 67–70.

18. ГОСТ 17.4.1.02-83. Охрана природы. Почвы. Классификация химических веществ для контроля загрязнения. Портал нормативных документов. URL: <http://www.OpenGost.ru>

References

1. Polyakova N.V., Zadorozhny P.A., Trukhin I.S., Sukhoverkhov S.V., Markin A.N., Avramenko V.A., Brikov A.V. Determination of the chemical composition of formation and sea waters, inorganic deposits sampled at oilfield platform Moliqpak // Oil Industry, 2018, vol. 4. doi: 10.24887/0028-2448-2018-4-43-47

2. Sagandzhieva L.K., Samtanova D.E. Chemical composition of formation waters and their influence on contamination of soils // Geologiya, geografiya i globalnaya energiya, 2013, no. 3(50), pp. 168–178.

3. Ivanishchev V.V., Evgrashkina T.N., Boykova O.I., Zhukov N.N. Soil salinization and its influence the plants // Izvestiya TulSU. Nauki o Zemle, 2020, no. 3, pp. 28–42.

4. Yaschenko I.G. Heavy vanadium-bearing oils of Russia // Bulletin of the Tomsk Polytechnic University, 2012, vol. 321, no 1, pp. 105–111.

5. Gorbov S.N., Bezuglova O.S., Varduni T.V., Gorovtsov A.V., Tagiverdiev S.S., Hildebrant Y.A. Genotoxicity and contamination of natural and anthropogenically transformed soils of the city of Rostov-on-Don with heavy metals // Eurasian Soil Science, 2015, vol. 48, no. 12, pp. 1383–1392.

6. Jampasri K., Saeng-ngam S. Phytoremediation of heavy metal and total petroleum hydrocarbon co-contaminated soil under salinity condition // SWU Sci. J., 2017, vol. 33, no. 2, pp. 229–246.

7. Sui X., Wang X., Li Y., Ji H. Remediation of petroleum-contaminated soils with microbial and microbial combined methods: advances, mechanisms, and challenges // Sustainability, 2021, vol. 13: 9267. doi:10.3390/su13169267

8. Charniauskaya M.I., Buklyarevich A.A., Akhremchuk A.E., Delegan Y.A., Filonov A.E., Titok M.A. Biodiversity of hydrocarbon-oxidizing soil bacteria from various climatic zones // Microbiology (Mikrobiologiya), 2018, vol. 87, no. 5, pp. 699–711.

9. Gupta A., Gupta R., Singh R.L. Microbes and environment // Principles and applications of environmental biotechnology for a sustainable future, applied environmental science and engineering for a sustainable future / Ed. by R.L. Singh. Springer Science, Business Media, Singapore, 2017, pp. 43–84.

10. Workshop on Microbiology / Ed. A.I. Netrusov. M.: Akademiya, 2005, 602 p.

11. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // Develop. Industr. Microbiol., 1961, vol. 2, no. 1, pp. 23–32.

12. Dobrovolskaya T.G., Skvortsova I.N., Lysak L.V. Methods for identification and isolation of soil bacteria. M.: Publishing House of Moscow State University, 1990, 76 p.

13. Korshunova T.Yu., Mukhamatdyarova S.R., Loginov O.N. Oxidation by bacteria of the strain *Acinetobacter* sp. ИБ ДТ-5.1/1 oil and oil hydrocarbons // Izvestiya Ufimskogo nauchnogo thentra RAS, 2013, no. 3, pp. 16–18.

14. Vetrova A.A., Ivanova A.A., Filonov A.E., Zabelin V.A., Nechaeva I.A., Le Thi Bich Nguyet, Boronin A.M. Comparative efficiency of oil degradation by consortium of plasmid-bearing degrader strains and biopreparations «MikroBak» and «Biooil» // Izvestiya TulSU. Estestvennye nauki, 2013, vol. 2(1), pp. 258–272.

15. Masindi V., Muedi K.L. Environmental contamination by heavy metals // Heavy Metals / Ed. by H.E.M. Saleh, R.F. Aglan. IntechOpen, London, 2018, pp. 115–132.

16. Cheng J., Sun Z., Yu Y., Li X., Li T. Effects of modified carbon black nanoparticles on plant-microbe remediation of petroleum and heavy metal co-contaminated soils // Int. J. Phytoremed, 2019, vol. 21, no. 7, pp. 634–642.

17. Giwa O.E., Ibitoye F.O. Bioremediation of heavy metal in crude oil contaminated soil using isolated Indigenous microorganism cultured with *E. coli* DE3 BL21 // Int. J. Engin. Appl. Sci., 2017, vol. 4, no. 6, pp. 67–70.

18. ГОСТ 17.4.1.02-83. Nature protection. Soils. Classification of chemicals for pollution control. 1985. Portal normativnyh dokumentov. URL: <http://www.OpenGost.ru>



**SCREENING FOR HYDROCARBON-OXIDIZING MICROORGANISMS RESISTANT TO
HEAVY METALS AND SODIUM CHLORIDE**

© T.Yu. Korshunova¹, E.V. Kuzina¹, S.R. Mukhamatdyarova¹, D.O. Loginov², Yu.Yu. Sharipova¹

¹ Ufa Institute of biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences,
69, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

² Ufa State Oil Technical University,
1, ulitsa Cosmonauts, 450064, Ufa, Russian Federation

In the process of extraction of hydrocarbon raw materials, in addition to mechanical disturbance of the soil cover, it is chemically contaminated with hydrocarbons and heavy metals contained in oil and oilfield wastewater, mainly of sodium chloride composition. Combined pollution has a more pronounced adverse effect on plants and soil biocenosis than each pollutant alone and leads to a very rapid loss of soil fertility. The aim of this work was to screen for new strains of hydrocarbon-oxidizing microorganisms resistant to elevated concentrations of sodium chloride and heavy metals. Isolation of strains of microorganisms from samples of technogenically contaminated soils from the territory of the Republic of Bashkortostan was carried out by the method of enrichment cultures on a liquid mineral medium of Raymond with oil. The hydrocarbon-oxidizing activity of the isolates was determined by the degree of destruction of the aliphatic oil fraction by the gas chromatographic method after extraction with hexane. The resistance of strains to the presence of sodium chloride and heavy metals (Zn, Co, Cd, Cu, Pb, Ni) was established by their growth on meat-peptone agar with various concentrations of NaCl or salts of these metals. Of the 14 isolated strains, 6 were selected, most actively growing on a solid medium with oil. The highest abundance and the most significant hydrocarbon-oxidizing activity during cultivation in a liquid medium with oil was found in strain 22 (the degree of oil biodegradation was 93.0%). All microorganisms were halotolerant and grew at 5 and 7% sodium chloride in the medium, but cultures 11 and 41, which withstood a NaCl concentration of 10%, turned out to be the most resistant to salinity. Strains 33.1 and 33.2 had the highest resistance to the action of metals. Lead and zinc were the least toxic to microorganisms. The results obtained should be considered preliminary, and the isolates themselves need further research with a view to their possible application in ecobiotechnology.

Keywords: bioremediation, oil-degrading bacteria, salinity, heavy metals, hydrocarbon-oxidizing activity.