

УДК 579.6

DOI: 10.31040/2222-8349-2023-0-3-42-49

**БАКТЕРИИ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРЫ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ
К ПРИСУТСТВИЮ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ ПОЛЛЮТАНТОВ****© Т.Ю. Коршунова, Е.В. Кузина, Ю.Ю. Шарипова, С.Р. Мухаматдырова,
М.Г. Искужина, М.В. Гаршин**

Во всем мире значительные площади сельскохозяйственных угодий загрязнены углеводородами. Их микробиологическая очистка затруднена присутствием остаточных количеств пестицидов (гербицидов, в частности), угнетающих жизнедеятельность бактерий-нефтедеструкторов. Кроме того, вместе с сырой нефтью в пахотные почвы могут попадать тяжелые металлы и соли (в основном хлориды), которые, в свою очередь, оказывают негативный эффект на микроорганизмы. Поэтому для биоремедиации таких территорий следует использовать углеводородокисляющие бактерии, устойчивые к дополнительным поллютантам. В настоящей работе выделены три изолята, способные к активному росту в жидкой среде с нефтью. С помощью времяпролетной матрично-активированной лазерной десорбционной-ионизационной (МАЛДИ-ВП) масс-спектрометрии фракции клеточных белков, секвенирования нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и филогенетического анализа определена видовая принадлежность микроорганизмов, которые относятся к роду *Acinetobacter*. Бактерии обладали значительной способностью к биодеградации нефти (71.8–74.1%), которую оценивали по степени деструкции алифатической фракции газохроматографическим методом после предварительной экстракции гексаном. Устойчивость микроорганизмов к наличию гербицидов, тяжелых металлов и хлорида натрия устанавливали по их росту на мясопептонном агаре с различными концентрациями препаратов, солей этих металлов или NaCl. Штаммы проявляли резистентность к присутствию в среде гербицидов на основе 2,4-Д и имазетапира в концентрации 10.0 мл/л, хлорида натрия в количестве 5.0–6.0% и ионов свинца (1.00–1.25 г/л). Кроме того, они продуцировали фермент липазу и были способны к фиксации атмосферного азота и растворению неорганического фосфата. Последние два свойства важны для стимуляции роста и развития растений-ремедиантов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что все три штамма имеют определенные перспективы применения для очистки нефтезагрязненных почв сельскохозяйственного назначения и нуждаются в дальнейшем изучении их биотехнологического потенциала.

Ключевые слова: сельскохозяйственные почвы, бактерии-нефтедеструкторы, *Acinetobacter* spp., гербициды, хлорид натрия, тяжелые металлы, азотфиксация, фосфатмобилизация.

В настоящее время проблема загрязнения окружающей среды в результате антропогенной деятельности носит глобальный характер [1]. При этом часто возникают ситуации, когда несколько видов поллютантов, например, нефть и гербициды, одновременно накапливаются

в почве. В большинстве случаев это связано с авариями на нефтепроводах, проходящих вблизи или по территории пашен или происходит на сельхозугодьях, переданных во временное пользование под нефтедобычу. Очистка почв, содержащих сразу несколько загрязнителей,

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

ШАРИПОВА Юлия Юпитеровна, Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,

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

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

e-mail: svetrm@gmail.com

ИСКУЖИНА Миляуша Галимьяновна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,

e-mail: ishmurzina82@mail.ru

ГАРШИН Михаил Владимирович, Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,

e-mail: garshin.mixail@yandex.ru

представляет собою серьезную проблему, поскольку они могут вступать в сложные взаимодействия, в результате которых токсический эффект, оказываемый ими на живые объекты, многократно усиливается [2, 3].

Биоремедиация обладает значительным потенциалом для восстановления природной среды благодаря своей дешевизне, легкодоступности и экологической безопасности [4]. Основная роль в этом процессе принадлежит микроорганизмам, способным к разложению ксенобиотиков благодаря наличию специфических ферментных систем. Однако для очистки нефтезагрязненных сельскохозяйственных почв, содержащих остаточные количества гербицидов, следует применять углеводородокисляющие микроорганизмы, которые, по меньшей мере, обладают устойчивостью к этим средствам защиты растений и могут осуществлять эффективную деструкцию нефти в их присутствии [5]. Особый интерес в этом отношении представляют бактерии рода *Acinetobacter*. Они распространены повсеместно и в качестве источника углерода могут использовать очень широкий круг веществ, что позволяет им участвовать в биодеградации значительного числа токсикантов, в том числе различных углеводородов [6, 7] и пестицидов [8–10]. Поэтому представляется интересным и актуальным выяснить, можно ли применять представителей этого рода для биоремедиации пахотных почв, загрязненных нефтью и гербицидами.

Целью данного этапа исследования было выделение и идентификация штаммов бактерий-нефтедеструкторов и проверка их на устойчивость к гербицидам разных классов, а также на наличие других свойств, значимых для экологической биотехнологии.

Объекты и методы исследования. Выделение штаммов микроорганизмов в чистую культуру производили из образцов почвы с места аварийного разлива нефти (Нефтеюганский район ХМАО-Югра, Тюменская обл.) и промышленно загрязненной почвы (г. Стерлитамак, Республика Башкортостан) методом накопительных культур [11]. Для этого 2 г почвы помещали в колбы со 100 мл жидкой минеральной среды Раймонда [12] с нефтью (4% объем.) и культивировали 7 сут при 28°C и 160 об./мин на шейкере-инкубаторе ES-20/60 («Biosan», Латвия). Далее изоляты высевали на мясопептонный агар (МПА) [11] и инкубировали при 28°C в течение 5 сут. Для дальнейших ис-

следований отбирали изоляты, наиболее активно растущие на твердой и жидкой среде Раймонда с нефтью в качестве единственного источника углерода.

Предварительную идентификацию штаммов проводили так, как описано [13] с помощью матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетной масс-спектрометрией (МАЛДИ-ВП МС) на приборе Autoflex II MALDI-TOF («Bruker Daltonics», Германия), оснащенный азотным лазером (337 нм), времяпролетным анализатором и рефлектроном. Спектры записывали в режиме положительных ионов со временем задержки 350 нс и ускоряющим напряжением 20 кВ. Диапазон масс – от 2 до 20 кДа. Для внешней калибровки использовали смесь Protein 1 Calibration Standard («Bruker Daltonics», Германия). Разрешение спектров составляло ± 2 Да (200 м.д.). Результирующие спектры каждого образца штамма получали суммированием спектров, зарегистрированных в 10–15 точках анализируемого вещества после 50 импульсов лазера. Масс-спектры обрабатывали с помощью пакетов программ Flex analysis 2.2 и Biotyper 2.0 («Bruker Daltonics», Германия). Для определения таксономической принадлежности штамма использовали программу Biotyper 3.0 («Bruker Daltonics», Германия). Каждому изоляту присваивали численный рейтинг идентификации (*score*). Согласно рекомендациям производителя, положительная идентификация на уровне рода возможна при $score \geq 1.7$, на уровне вида – при $score \geq 2.0$. $score < 1.7$ обозначает отсутствие идентификации.

Для уточнения видовой принадлежности микроорганизмов проводили секвенирование фрагмента последовательности гена 16S рРНК. Тотальную ДНК выделяли по методике, описанной [14]. Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК осуществляли с универсальными праймерами 27F и 1492R [15] на термоциклере GeneAmp PCR System 2400 («Perkin-Elmer», США) с последующей очисткой ПЦР-продуктов с помощью набора QIAquick PCR purification Kit по протоколу фирмы-изготовителя («QIAGEN», Великобритания). Секвенирование проводили на генетическом анализаторе ABI PRISM 3130x1 («Applied Biosystems», США) с использованием набора реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США) согласно инструкциям производителя. Полученные результаты были проанализированы с

помощью онлайн-сервиса BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) для поиска гомологичных нуклеотидных последовательностей.

Филогенетическое древо на основе нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК конструировали в программе MEGA (version 11.0.11) (<http://www.megasoftware.net>) методом Neighbor-joining [16].

Угледородокисляющую активность штаммов оценивали по степени деструкции алифатической фракции нефти с помощью метода газовой хроматографии [17]. Бактерии культивировали в жидкой среде Раймонда с нефтью (4% объем.) при 24°C в течении 5 сут. В качестве эталона использовали штамм-нефтедеструктор *Acinetobacter calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 [18]. После инкубации парафиново-нафтеновую фракцию нефти экстрагировали гексаном и анализировали на газовом хроматографе («Кристалл Люкс 4000», Россия) с пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой Zebtron™ ZB-1XT (30 м × 0.53 мм × 2.65 мкм). Режим анализа: начальная температура колонки 100°C, скорость нагрева 5°C/мин, конечная температура 270°C, газ-носитель – гелий. Степень биодеструкции нефти (%) рассчитывали на основе хроматографических данных в соответствии с инструкциями к прибору.

Способность к росту при использовании в качестве источника углерода ароматических углеводов (бензойная кислота, фенол, нафталин) проверяли по изменению окраски среды при добавлении индикатора бромтимолового синего и по численности микроорганизмов после инкубирования в жидкой среде Раймонда при 28°C при 160 об./мин в течении 7 сут.

Устойчивость бактерий к действию гербицидов определяли визуально по интенсивности роста на МПА с добавлением различных кон-

центраций препаратов (1.0–10.0 мл/л) после 7 сут культивирования при 28°C. Использовали селективные гербициды российского производства (табл. 1). Выбор для исследования готовых препаративных форм обусловлен тем, что они содержат добавки, токсичность которых превышает таковую у действующего вещества [19].

Устойчивость штаммов к хлориду натрия и тяжелым металлам (Zn, Co, Cd, Pb, Cu, Ni) оценивали визуально по их росту на МПА с NaCl или солями этих металлов ($ZnSO_4 \times 6H_2O$, $CoCl_2 \times 2H_2O$, $Cd(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$, $Pb(CH_3COO)_2 \times 3H_2O$, $CuSO_4 \times 5H_2O$, $NiCl_2 \times 6H_2O$) после инкубации в течение 7 сут при 28°C. Концентрацию NaCl варьировали в пределах 3.0–7.0%, ионов металлов 0.25–1.50 г/л.

Продукцию микроорганизмами липазы ус-танавливали по наличию непрозрачной зоны кальциевых солей жирных кислот на среде с Твин 80 [11].

Наличие азотфиксирующей активности выявляли по показателям роста на среде Эшби [11] при 28°C. Штаммы считали активными, если численность их клеток за 72 ч культивирования увеличивалась с 10^5 до 10^9 КОЕ/мл и более. Меньшая скорость роста интерпретировалась как слабый рост.

Способность микроорганизмов к растворению неорганических фосфатов определяли на среде Пиковской [20] со свежесажженным ортофосфатом кальция через 10 сут культивирования по размеру диаметра зон просветления вокруг колоний бактерий. На основании этих измерений индекс солюбилизации (SI) рассчитывали следующим образом: диаметр ореола (мм)/диаметр колонии (мм). Принимали, что при $SI < 2$ изолят обладает низким, SI равен 2–3 – средним, если $SI > 3$ – высоким потенциалом солюбилизации [21].

Т а б л и ц а 1

Характеристика гербицидов

Препарат	Производитель	Действующее вещество	Объект воздействия
Октапон экстра	ООО «АХК-АГРО»	2,4-дихлор-феноксисукусная кислота (2,4-Д)	двудольные растения
Чисталан	ООО «АХК-АГРО»	2,4-Д (2-этилгексильный эфир) + дикамба (натриевая соль)	двудольные растения
Тапир	ООО «Агро Эксперт Групп»	имазетапир	двудольные и злаковые растения
Гермес	ЗАО «Щелково Агрохим»	имазамокс + хизалофоп-П-этил	двудольные и злаковые растения
Фенизан	ЗАО «Щелково Агрохим»	дикамба + хлорсульфурон	двудольные растения, в т.ч. устойчивые к 2,4-Д

Все эксперименты проводили в трех повторностях. 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 26 визуально различающихся при выращивании на МПА изолятов для дальнейших исследований были отобраны восемь изолятов, которые характеризовались наиболее интенсивным ростом на агаризованной и жидкой среде Раймонда с нефтью. При их культивировании в жидкой среде наблюдалось практически полное исчез-

новение нефтяной пленки на ее поверхности и на стенках колб, диспергирование нефти, выпадение хлопьеобразного осадка.

С помощью МАЛДИ–ВП МС у этих микроорганизмов была изучена фракция клеточных белков. На основании полученных данных три из восьми изолятов были отнесены к роду *Acinetobacter*. score C2 соответствовал высокой степени точности видовой идентификации, а score H3.2 и H4.1 – уровню достоверности родовой идентификации (табл. 2). Дальнейшие исследования проводились именно с этими бактериями, для уточнения видовой принадлежности которых был проведен сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК (табл. 2) и построено филогенетическое древо (рис.).

Т а б л и ц а 2

Идентификация изолятов с помощью разных методов анализа

Изолят	Наиболее близкородственный штамм	
	МАЛДИ–ВП МС (score, уровень идентификации)	Секвенирование гена 16S рРНК (% гомологии)
C2	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> CCM 4665 (2.356, достоверность видовой идентификации)	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (100.00)
H3.2	<i>Acinetobacter</i> sp. (1.868, достоверность родовой идентификации)	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (99.93)
H4.1	<i>Acinetobacter</i> sp. (1.774, достоверность родовой идентификации)	<i>Acinetobacter seifertii</i> (99.86)

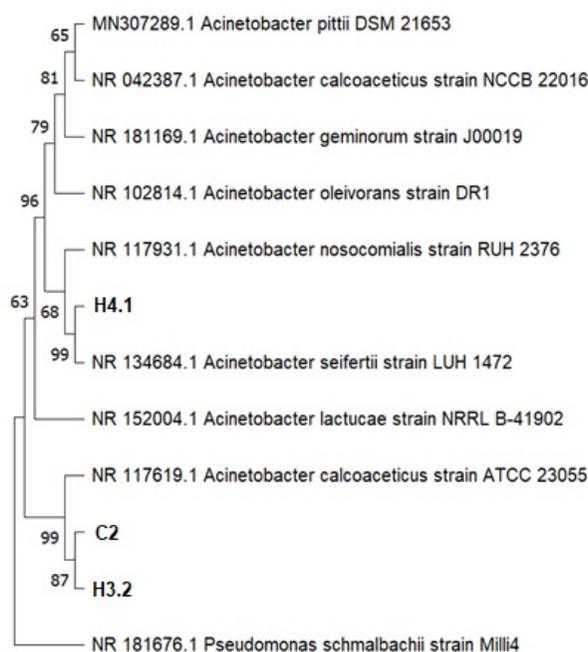


Рис. Филогенетическое древо штаммов C2, H3.2 и H4.1, построенное на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК бактерий рода *Acinetobacter*. В качестве внешней группы использована последовательность гена 16S рРНК *Pseudomonas schmalbachii*. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью «bootstrap»-анализа (приведены значения выше 60%)

Изоляты С2 и Н3.2 обладали самым высоким уровнем гомологии с типовым штаммом *A. calcoaceticus* ATCC 23055 (100.0 и 99.93% соответственно) и входили с ним в общий кластер на дендрограмме, а наиболее близкородственным штаммом к изоляту Н4.1 был *A. seifertii* LUN 1472(Т) (99.86%), с которым они образовывали один кластер (табл. 2, рис.).

Таким образом, на основании МАЛДИ-ВП масс-спектрального анализа рибосомных белков и секвенирования фрагмента гена 16S рРНК, а также изучения филогенетического положения, штаммы С2 и Н3.2 отнесены к виду *A. calcoaceticus*, а штамм Н4.1 – к виду *A. seifertii*.

Все бактерии обладали приблизительно одинаковой способностью к разложению нефти в жидкой среде (табл. 3), которая находилась на уровне эталонного штамма *A. calcoaceticus* ИБ ДТ-5.1/1 (73.3%).

В присутствии ароматических соединений установлен активный рост штамма *A. seifertii* Н4.1 и слабый – *A. calcoaceticus* С2 (возрастание титра на 3–4 и 1 порядок соответственно). Штамм *A. calcoaceticus* Н3.1 проявил избирательность в отношении потребляемых субстратов. Его численность увеличилась на 2 порядка при использовании фенола и на 4 порядка – при

добавлении в среду бензойной кислоты (табл. 3). При этом отмечено подавляющее действие нафталина на ростовые характеристики *A. calcoaceticus* Н3.1.

Штаммы *A. calcoaceticus* С2 и *A. seifertii* Н4.1 демонстрировали толерантность к максимальной концентрации гербицида Октапон экстра (10 мл/л), в то время как *A. calcoaceticus* Н3.1 проявлял большую чувствительность и не выдерживал его присутствие в количестве более 5 мл/л. Все бактерии были малоустойчивы к наличию в среде Чисталана (не более 2.5 мл/л). Действующим веществом обоих препаратов является 2,4-Д, однако в состав Чисталана входит еще один компонент – дикамба, которая, вероятно, является токсичной для изучаемых *Acinetobacter* spp. Аналогичная картина наблюдалась и для гербицидов Тапир и Гермес на основе имазетапира и имазамокса – веществ, сходных по своей структуре и относящихся к одному классу химических соединений (имидазолиноны). Бактерии были резистентны к Тапиру во всем диапазоне заявленных концентраций, но не выдерживали более 5 мл/л гербицида Гермес, дополнительно содержащего хизалофоп-П-этил. Гербицид Фенизан был наиболее токсичен для выделенных микроорганизмов, скорее всего, за счет подавляющего действия дикамбы [21].

Т а б л и ц а 3

Свойства штаммов

Свойства	Штамм			
	<i>A. calcoaceticus</i> С2	<i>A. calcoaceticus</i> Н3.2	<i>A. seifertii</i> Н4.1	
Степень биодеструкции нефти, %	74.1	71.8	72.7	
Численность в присутствии ароматических соединений, КОЕ/мл*	фенол	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
	бензойная кислота	10 ⁵	10 ⁸	10 ⁸
	нафталин	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁸
Максимальная концентрация гербицида, мл/л	Октапон экстра	10.0	5.0	10.0
	Чисталан	1.5	2.5	1.5
	Тапир	10.0	10.0	10.0
	Гермес	5.0	5.0	5.0
	Фенизан	1.0	1.0	1.0
Максимальная концентрация NaCl, %	5.0	5.0	6.0	
Максимальная концентрация металла, г/л	Pb ²⁺	1.0	1.25	1.25
	Zn ²⁺	0.25	0.25	0.25
	Cd ²⁺	< 0.25	< 0.25	< 0.25
	Co ²⁺	< 0.25	< 0.25	0.25
	Cu ²⁺	0.25	< 0.25	< 0.25
	Ni ²⁺	0.25	0.25	0.25
Липолитическая активность	+	+	+	
Азотфиксирующая активность	+	+	+	
Индекс солюбилизации	3.3±0.2	3.1±0.1	2.8±0.1	

Примечания: «*» – начальный титр микроорганизмов в среде 10⁴ КОЕ/мл. «+» – наличие признака.

Помимо остаточных количеств гербицидов, в нефтезагрязненных почвах могут находиться и другие вещества, затрудняющие микробиологическую очистку. Так, в сырой нефти в значительных количествах присутствуют соли, попадающие в нее при закачке воды в процессе добычи. Большая их часть приходится на хлориды и, в частности, на NaCl [22], способный ингибировать жизнедеятельность почвенной микробиоты [23]. Кроме того, в нефти обнаруживаются тяжелые металлы, содержание которых может достигать 1 г/кг [24]. Также они могут поступать в почву в результате нарушения регламента применения пестицидов и минеральных удобрений [25]. Тяжелые металлы вызывают повреждения клеточных структур, негативно влияют на биосинтетические процессы у микроорганизмов и снижают разнообразие и биомассу их сообществ [26]. Поэтому для ликвидации последствий аварийных разливов сырой нефти необходимо использовать углеводородокисляющие микроорганизмы, способные переносить повышенные концентрации солей и тяжелых металлов. Изучаемые представители рода *Acinetobacter* проявляли устойчивость к хлориду натрия в количестве 5.0–6.0% и такому высокотоксичному металлу как свинец [27] при его содержании в среде 1.0–1.25 г/л (табл. 3). Это свидетельствует о возможности их применения для очистки сельскохозяйственных почв, подвергшихся загрязнению сырой нефтью.

Наличие у выделенных штаммов липазной активности (табл. 3) является их дополнительным преимуществом как нефтедеструкторов, благодаря тому, что этот фермент сам по себе эффективно разлагает углеводороды [28]. Кроме того, микроорганизмы активно росли на среде без дополнительного источника азота и обладали средним или высоким индексом мобилизации (SI 2.8–3.3) (табл. 3). Растворение неорганических соединений фосфора и микробиологическая фиксация атмосферного азота, являющихся наиболее значимыми элементами в минеральном питании растений [29–31], повышает их доступность для растений и позволяет снизить дозы вносимых удобрений, минимизировать химическую нагрузку на окружающую среду, уменьшить стоимость технического этапа биорекультивации и ускорить рост и развитие фиторемедиантов.

Таким образом, из образцов антропогенно нарушенных почв выделены и идентифицированы штаммы микроорганизмов *Acinetobacter*

calcoaceticus C2, *A. calcoaceticus* H3.2 и *A. seifertii* H4.1, которые проявляли значительную степень биодеструкции нефти (71.8–74.1%). Помимо этого, бактерии обладали устойчивостью к присутствию дополнительных поллютантов, таких как гербициды на основе 2,4-Д и имазетапира, хлорид натрия в количестве 5.0–6.0%, ионы свинца (1.00–1.25 г/л) и набором других биотехнологически значимых свойств, включая азотфиксацию, фосфатмобилизацию и продукцию липазы. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения изученных микроорганизмов для очистки от нефтяного загрязнения почв сельскохозяйственного назначения.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00130, <https://rscf.ru/project/23-24-00130/>.

Литература

1. Mishra S., Huang Y., Li J., Wu X., Zhou Z., Lei Q., Bhatt P., Chen S. Biofilm-mediated bioremediation is a powerful tool for the removal of environmental pollutants // *Chemosphere*. 2022. 294: 133609. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133609>
2. Subashchandrabose S.R., Megharaj M., Venkateswarlu K., Naidu R. Interaction effects of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals on a soil microalga *Chlorococcum* sp. MM11 // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2015. V. 22. P. 8876–8889.
3. Ye S., Zeng G., Wu H., Zhang C., Dai J., Liang J., Yu J., Ren X., Yi H., Cheng M., Zhang C. Biological technologies for the remediation of co-contaminated soil // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2017. V. 37(8). P. 1062–1076.
4. Ławniczak Ł., Woźniak-Karczewska M., Loibner A.P., Heipieper H.J., Chrzanowski Ł. Microbial degradation of hydrocarbons – basic principles for bioremediation: a review // *Molecules*. 2020. 25(4): 856. <https://doi.org/10.3390/molecules25040856>
5. Korshunova T., Kuzina E., Mukhamatdyarova S., Sharipova Y., Iskuzhina M. Promising strains of hydrocarbon-oxidizing pseudomonads with herbicide resistance and plant growth-stimulating properties for bioremediation of oil-contaminated agricultural soils // *Agriculture*. 2023. 13(6): 1111. <https://doi.org/10.3390/agriculture13061111>
6. Jung J., Park W. *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99. P. 2533–2548.
7. Kotoky R., Das S., Singha L.P., Pandey P., Singha K.M. Biodegradation of benzo(a)pyrene by biofilm-forming and plant growth promoting *Acinetobacter* sp. strain PDB4 // *Environ. Technol. Innovation*. 2017. V. 8(11). P. 256–268.

8. Ha D.D., Nguyen T.O. Degradation of propanil by *Acinetobacter baumannii* DT immobilized in alginate // Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering. 2022. V. 64(3). P. 8–12.
9. Liu C.-G., Yang X., Lai Y., Lu H.-G., Zeng W.-M., Geng G., Yang F.-S. Imazamox microbial degradation by common clinical bacteria: *Acinetobacter baumannii* IB5 isolated from black soil in China shows high potency // J. Integr. Agric. 2016. V. 15(8). P. 1798–1807.
10. Yang F., Wei Y., Sun C., Yuan M., Zeng W., Liu C., Fu H. Pinoxaden degradation characteristics of *Acinetobacter pittobacter* and prediction of related genes // Microbiology. 2022. V. 91. P. 818–830.
11. Практикум по микробиологии / под ред. А.И. Нетрусова. М.: Академия, 2005. 602 с.
12. Raymond R.L. Microbial oxidation of n-paraffinic hydrocarbons // Develop. Industr. Microbiol. 1961. V. 2. № 1. P. 23–32.
13. Prisyazhnaya N.V., Plotnikova E.G., Bueva O.V., Korsakova E.S., Dorofeeva L.V., Il'ina E.N., Lebedev A.T., Evtushenko L.I. Application of MALDI-TOF mass spectrometry for differentiation of closely related species of the «*Arthrobacter crystallopoietes*» phylogenetic group // Microbiology. 2012. V. 81. P. 696–701.
14. Wilson K. Current protocols in molecular biology / Eds. F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl. New York: Green Publishing Associates, 2003. P. 241–245.
15. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // Nucleic acid techniques in bacterial systematic / Eds. E. Stackebrandt, M. Goodfellow. Chichester: John Wiley and Sons, Ltd., 1991. P. 115–177.
16. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 406–425.
17. Борзенков И.А., Милехина Е.И., Готоева М.Т., Розанова Е.П., Беляев С.С. Свойства углеводородокисляющих бактерий, изолированных из нефтяных месторождений Татарстана, Западной Сибири и Вьетнама // Микробиология. 2006. Т. 75. № 1. С. 82–89.
18. Мухаматдырова С.Р., Коршунова Т.Ю., 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.
19. Jason P. van de Merwe, Peta A. Neale, Steven D. Melvin, Frederic D.L. Leusch. In vitro bioassays reveal that additives are significant contributors to the toxicity of commercial household pesticides // Aquatic Toxicol. 2018. V. 199. P. 263–268.
20. Пиковская Р.И. Мобилизация фосфатов в почве в связи с жизнедеятельностью некоторых видов микробов // Микробиология. 1948. Т. 17. С. 362–370.
21. Lisboa P.H.G., de Andrade P.H.M., Machado P.C., de Sousa C.P., Lacava P.T. Isolation and in vitro screening of plant growth-promoting rhizobacteria from *Solanum lycocarpum* St. Hil., an endemic plant of the Brazilian tropical savannah // Afr. J. Microbiol. Res. 2021. V. 5. P. 253–261.
22. Тимофеева М.Г., Актуганов Г.Э., Крутьков В.М., Галимзянова Н.Ф. Влияние различных групп синтетических пестицидов на развитие, выживаемость и антагонистическую активность некоторых видов аэробных спорообразующих бактерий // Известия СНЦ РАН. 2011. Т. 13. № 5(2). С. 239–243.
23. 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.
24. Gao Y., Wang J., Guo S., Hu Y.-L., Li T., Mao R. Effects of salinization and crude oil contamination on soil bacterial community structure in the Yellow river delta region, China // Appl. Soil Ecol. 2015. V. 86. P. 165–173.
25. Gondall M.A., Hussain T., Yamari Z.H., Baig M.A. Detection of heavy metals in Arabian crude oil residue using laser induced breakdown spectroscopy // Talanta. 2006. V. 69. P. 1072–1078.
26. Li Q., Liu J., Gadd G.M. Fungal bioremediation of soil co-contaminated with petroleum hydrocarbons and toxic metals // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. P. 8999–9008.
27. Фокина А.И., Ашихмина Т.Я., Домрачева Л.И., Горностаева Е.А., Огородникова С.Ю. Тяжелые металлы как фактор изменения метаболизма у микроорганизмов (обзор) // Теоретическая и прикладная экология. 2015. № 2. С. 5–18.
28. ГОСТ 17.4.1.02-83. Охрана природы. Почвы. Классификация химических веществ для контроля загрязнения. Портал нормативных документов. URL: <http://www.OpenGost.ru> (дата обращения 01.06.2023)
29. Vamitale O.M., Ayomikun A.M. Biodegradation potential of tropical hydrocarbon degrading *Providencia stuartii* // Trends Appl. Sci. Res. 2020. V. 15. P. 253–259.
30. Mikala P.S.A., Wasonga D.O., Solano Hernandez A., Santanen A. Seedling growth and phosphorus uptake in response to different phosphorus sources // Agronomy. 2020. 8: 1089. <https://doi.org/10.3390/agronomy10081089>
31. Razaq M., Zhang P., Shen H.-l., Salahuddin. Influence of nitrogen and phosphorous on the growth and root morphology of *Acer mono* // PLoS ONE. 2017. 12(2): e0171321. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171321>
32. Anas M., Liao F., Verma K.K., Sarwar M.A., Mahmood A., Chen Z.L., Li Q., Zeng X.P., Liu Y., Li Y.R. Fate of nitrogen in agriculture and environment: agronomic, eco-physiological and molecular approaches to improve nitrogen use efficiency // Biol Res. 2020. 53(1): 47. <https://doi.org/10.1186/s40659-020-00312-4>



**OIL-DESTRUCTOR BACTERIA WITH RESISTANCE
TO THE PRESENCE OF ADDITIONAL POLLUTANTS**

© T.Yu. Korshunova, E.V. Kuzina, Yu.Yu. Sharipova, S.R. Mukhamatdyarova,
M.G. Iskuzhina, M.V. Garshin

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

Throughout the world, significant areas of agricultural land are polluted with hydrocarbons. Their microbiological purification is hampered by the presence of residual amounts of pesticides (herbicides, in particular), which inhibit the vital activity of oil-destructing bacteria. In addition, along with crude oil, heavy metals and salts (mainly chlorides) can enter arable soils, which, in turn, have a negative effect on microorganisms. Therefore, for the bioremediation of such territories, hydrocarbon-oxidizing bacteria resistant to the presence of additional pollutants should be used. In the present work, three isolates were identified that are capable of active growth in a liquid medium with oil. Using time-of-flight matrix-activated laser desorption-ionization (MALDI-TOF) mass spectrometry of the cellular protein fraction, sequencing of the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene and phylogenetic analysis, the species of microorganisms belonging to the genus *Acinetobacter* was determined. The bacteria had a significant ability to biodegrade oil (71.8–74.1%), which was estimated from the degree of destruction of the aliphatic oil fraction by the gas chromatographic method after preliminary extraction with hexane. The resistance of microorganisms to the presence of herbicides, heavy metals, and sodium chloride was determined by their growth on meat-peptone agar with different concentrations of preparations, salts of these metals, or NaCl. The strains showed resistance to the presence in the medium of herbicides based on 2,4-D and imazethapyr at a concentration of 10.0 ml/l, sodium chloride in an amount of 5.0–6.0%, and lead ions (1.00–1.25 g/l). In addition, they produced lipase and were capable of fixing atmospheric nitrogen and dissolving inorganic phosphate. The last two properties are important for stimulating the growth and development of remedial plants. The obtained results indicate that all three strains have certain prospects of application for cleaning oil-contaminated agricultural soils and require further study of their biotechnological potential.

Keywords: agricultural soils, oil degrading bacteria, *Acinetobacter* spp., herbicides, sodium chloride, heavy metals, nitrogen fixation, phosphate mobilization.