

НЕУСТРОЕВ МИХАИЛ МИХАЙЛОВИЧ

**ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ МЕРЗЛОТНЫХ ПОЧВ И  
РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ИХ БИОРЕМЕДИАЦИИ**

03.02.08. – экология  
(биологические науки)

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Якутск - 2016

Работа выполнена на кафедре биохимии и биотехнологии Института естественных наук Северо-Восточного федерального университета им М.К. Аммосова и в лаборатории по разработке микробных препаратов ФГБНУ Якутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент.  
**Сазонов Николай Никитич**

Официальные оппоненты: **Данилова Альбина Афанасьевна,**  
доктор биологических наук, старший научный сотрудник.  
ФГБНУ Сибирский научно-исследовательский институт земледелия и химизации, старший научный сотрудник.

**Бабусенко Елена Сергеевна,**  
кандидат биологических наук, доцент.  
ФГБОУ ВО Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, доцент кафедры биотехнологии.

Ведущая организация: ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет»

Защита состоится «17» марта 2016г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.306.03 при ФГАОУ ВПО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова» по адресу: 677000, г. Якутск, Белинского 58.  
e-mail: dsovet\_nefu@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГАОУ ВПО СВФУ им. М.К. Аммосова: [www.s-vfu.ru](http://www.s-vfu.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Данилова Надежда  
Софронова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Одной из основных экологических проблем в регионах развития нефтегазовой отрасли является загрязнение объектов окружающей среды нефтью и нефтепродуктами. В настоящее время широко ведутся работы по добыче, переработке, транспортировке, потреблению нефти и газа в северных регионах России, почвы которых характеризуются относительно низкой самоочищающей способностью. Нефть и продукты ее переработки, многие из которых чрезвычайно токсичны, канцерогенны и персистентны, то есть разрушаются крайне медленно, особенно, в Сибири с ее холодным климатом [Маркарова, 1999; Киреева, и др., 2008; Житин, Захаров, 2009; Корнейкова, и др. 2011].

Особую роль при решении проблем окружающей среды приобретают использование живых организмов, в частности, микроорганизмов. При нефтезагрязнениях разрабатываются и используются различные методы биоремедиации (биовосстановления) с применением микроорганизмов [Пономарева и др., 2005; Киреева и др., 2008; Орлова и др., 2008; Безуглова и др., 2009; Кочетова, 2010]. Работ, посвященных изучению микроорганизмов, используемых в деструкции нефти и нефтепродуктов при биоремедиации в северных регионах, крайне мало [Пырченкова и др., 2006; Глянцева и др., 2011]. В последние десятилетия отмечается активный поиск и разработка высокоэффективных универсальных микробных препаратов, конструированных из полезных эндофитных и ризосферных бактерий. Среди них особый интерес представляют бактерии рода *Bacillus*, которые составляют от 30 до 36 % микробной ризосферной и эндофитной популяции [Чеботарь и др., 2011]. В микробиоценозе мерзлотных почв Якутии доминируют бактерии рода *Bacillus*, которые обладают широким спектром выраженных антагонистических, ферментных, интерферониндуцирующих, иммуномодулирующих свойств и являются одним из перспективных групп в биотехнологии [Тарабукина и др., 2011]. Вместе с тем, не достаточно изучено сочетание нефтеокисляющих, антифунгальных и ростостимулирующих свойств, аборигенных штаммов бактерий рода *Bacillus*, востребованных для современной экологической биотехнологии. Актуальность проблемы возрастает с освоением и разработкой месторождений нефти в Республике Саха (Якутия), строительством нефтепроводной системы «Восточная Сибирь-Тихий океан», и недостаточностью исследований по изысканию эффективных, экологически безопасных способов биологической очистки мерзлотных почв от нефтезагрязнений.

**Цель работы.** Дать экологическую оценку нефтезагрязненным мерзлотным почвам и разработать способы их биоремедиации с применением штаммов бактерий *Bacillus subtilis*.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Провести экологическую оценку по нефтезагрязнениям окружающей среды на территории Республики Саха (Якутия).
2. Изучить остаточное влияние нефтезагрязнений на микробиологические, агрохимические показатели мерзлотных почв после восстановительных работ.
3. Изучить углеводородокисляющие, эмульгирующие, антифунгальные, фитотоксические свойства штаммов бактерий *Bacillus subtilis*.
4. Разработать биологический способ восстановления нефтезагрязненных мерзлотных почв.

**Основные положения, выносимые на защиту.**

Остаточные загрязнения нефтью негативно влияют на структуру микробиоценозов мерзлотных дерново-остепненных, дерново-лугово-суглинистых, дерново-перегноино-болотных почв;

Штаммы аборигенных бактерий *Bacillus subtilis*, обладающие выраженными углеводородокисляющими, эмульгирующими и антифунгальными, также умеренно ростостимулирующими свойствами, могут служить основой биопрепаратов для восстановления нефтезагрязненных мерзлотных почв.

**Научная новизна.** По результатам изучения нефтеокисляющих свойств штаммы бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма – 7/2к» и *Bacillus subtilis* «Оймякон – 6/1» паспортизированы и депонированы во Всероссийской коллекции непатогенных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения, как перспективные для восстановления нефтезагрязненных мерзлотных почв, под регистрационными номерами «СИАМ 167» и «СИАМ 168» в группе спорных микроорганизмов (справки ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии № 616/12 и № 617/12 от 20.12.2009 г.).

**Практическая значимость.** Впервые предложен биологический способ восстановления нефтезагрязненных мерзлотных почв. Научная новизна разработки подтверждена получением 2 патентов РФ «Способ очистки мерзлотных почв от нефти спорообразующими бактериями *Bacillus subtilis*» (№ 2446900, приоритет изобретения 13.07.2010 г., зарегистрирован в Государственном реестре изобретений РФ 10.04.2012 г.), «Способ биоремедиации нефтезагрязненных мерзлотных почв» (№ 2538125, приоритет изобретения 04.07.2013 г.; зарегистрирован в Государственном реестре изобретений РФ 17.11.2014 г.).

Представленные в работе результаты исследований по изысканию способов биоремедиации нефтезагрязненных почв могут быть использованы как эффективные, экологически безопасные методы восстановления мерзлотных почв.

**Апробация работы.** Основные результаты исследований доложены: IX Международном симпозиуме по развитию Холодных регионов ISCORD-2010 (Якутск, 2010), V-VI Международных конференциях по мамонтам и их сородичам (de Puy-en-Velay, 2010, и Grivena-Siatista, 2014), международной конференции с элементами научной школы для молодежи «Перспективы фитобиотехнологии для улучшения качества жизни на Севере» (Якутск, 2010), научно-практической конференции молодых ученых «Основные направления развития аграрной науки в работах молодых ученых» (Тыва, 2011), научной сессии «Эволюция и палеоэкология млекопитающих позднего кайнозоя Сибири» (Якутск, 2011), всероссийской научно-практической конференции с элементами научной школы для молодежи «Живые системы и конструкционные материалы в условиях криолитозоны» (Якутск, 2011), всероссийской научно-практической конференции (с международным участием) «Современные проблемы мерзлотного почвоведения и прикладной экологии Севера» (Якутск, 2012), на университетском научно-инновационном конкурсе учащийся молодежи «УНИКУМ - Интеллектуальный» (Якутск, 2013), на молодежном научно-инновационном конкурсе «УМНИК» фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (Якутск, 2014), 4-ом Международном совещании по сохранению лесных генетических ресурсов Сибири (Барнаул, 2015 г.).

**Публикации результатов исследований.** По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ: 2 статьи в рецензируемых ВАК Минобрнауки РФ и 2- международных журналах, 2- в описаниях к патентам РФ и 7- в материалах и сборниках конференций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 131 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов, использованных методик, 4 глав, с анализом собственных результатов и их обсуждения, выводов и списка использованной литературы, включающего 231 наименований отечественных, и в том числе 78 иностранных источников.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи работы, научная новизна и практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту.

**Глава 1. Обзор литературы.** Проведен анализ литературных данных, касающихся разработки проблем окружающей среды с использованием живых организмов, в особенности микроорганизмов, входящих в область экологической биотехнологии. Основными биологическими системами, осуществляющими биоразрушения, являются микроорганизмы, обладающие огромным разнообразием ферментных систем и большой лабильностью метаболизма, способные разлагать широкий спектр химически устойчивых соединений, тем самым,

возвращающие основные питательные элементы в глобальные циклы и предотвращающие накопление «мертвых» остатков в биосфере. Более подробно охарактеризована роль микроорганизмов, биопрепаратов, биосорбентов в биоремедиации почв от нефти и нефтепродуктов, значение психрофильности, галотолерантности, наличия био-ПАВов в углеводородоокисляющих микроорганизмах, используемых при восстановлении в условиях низких температур. В частности, в обзоре литературы особое внимание отводится бактериям рода *Bacillus*, как одной из перспективных групп микроорганизмов, используемых в современной экологической биотехнологии.

**Глава 2. Материал и методы исследований** Объектом исследований являлись образцы нефтезагрязненных мерзлотных почв Амгинского района РС (Я) после проведения восстановительных работ, также штаммы бактерий рода *Bacillus* выделенные из палеомикрофлоры и мерзлотных почв.

Образцы почв отбирали, из различных горизонтов почвенного профиля (0-20;20-50 см) в соответствии с ГОСТ 17.4.3.01-83 и ГОСТ 17.4.4.02-83 «Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб». Определение горизонтов почвенного профиля проведены под руководством д.б.н., профессора Д.Д. Саввинова, согласно определений «Почвы Якутии» [1989]. Методика подготовки проб почвы для агрохимических исследований (ГОСТ 2642-85). Агрохимические исследования выполнены на ИК анализаторе NIR SCANNER model 4250, в лаборатории биохимии и массового анализа ФГБНУ ЯНИИСХ. Отбор и подготовка почвенных образцов для микробиологических исследований согласно методов почвенной микробиологии и биохимии [Под ред. проф. Д.Т. Звягинцева, МГУ, 1991 г.]. Для определения общего количества микроорганизмов, усваивающих органические формы азота использовали мясо-пептонный агар (МПА), минеральные формы азота – крахмало-аммиачный агар (КАА), микроскопических грибов – среду Чапека, углеводородоокисляющих микроорганизмов – среду Маккланга. Количество микроорганизмов определяли в колониеобразующих единицах (КОЕ) в 1 г. Идентификацию микроорганизмов проводили согласно «Определителю бактерий Берджи» [1997], так же использовали «Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий группы *Bacillus subtilis – mesentericus* из организма человека и животных» [1980]. Изучение антифунгальных свойств проводили методом диффузии в агар, согласно «Справочнику по микробиологическим и вирусологическим методам исследований» [1982], «Определителю зоопатогенных микроорганизмов» [1995], «Практикуму по микробиологии» [2005]. При исследовании популяций микроорганизмов в сканирующем электронном микроскопе проводили по методике И.Б. Павловой [2004].

Фитотоксическую активность микроорганизмов определяли по всхожести семян (ГОСТ 19449-93), эмульгирующую активность по методу D.L. Gutnik [1987].

Химические анализы почвы на содержание нефтепродуктов проведены в аккредитированных лабораториях ГБУ РИАЦЭМ МОП РС (Я) и ИПНГ СО РАН с использованием методов флуориметрии (ПДН Ф 16.1.21-98) и хлороформной экстракции

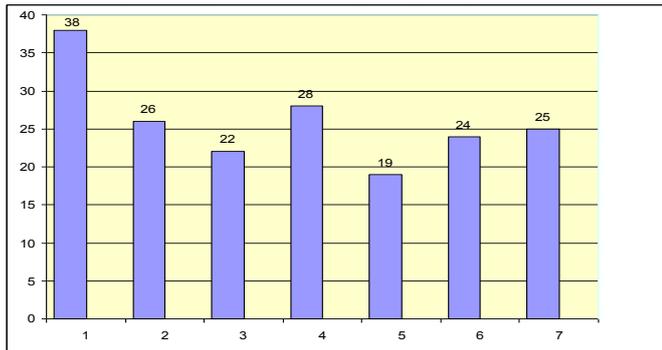
Математическую обработку полученных данных проводили с использованием прикладной программы Snedecor, Microsoft Excel. Результаты исследований подвергали статистической обработке по методу Стьюдента.

## **Глава 3. Результаты и обсуждения**

### **3.1 Экологическая оценка загрязнения окружающей среды нефтепродуктами на территории Республики Саха (Якутия).**

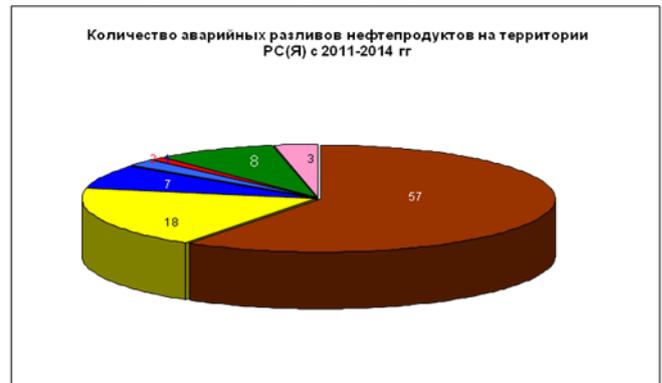
За период с 2008-2014 гг. на территории республики произошло 182 случаев аварийного сброса нефтепродуктов. (рис. 3.1.1)

Рис. 3.1.1 – Динамика аварийных случаев разлива нефтепродуктов



Примечание: 1 – 2008 г.; 2 – 2009 г.; 3 – 2010 г.; 4 – 2011 г.; 5 – 2012 г.; 6 – 2013 г.; 7 – 2014 г.

Рис. 3.1.2 – Кол-во аварийных случаев разлива нефтепродуктов



За 2011-2014 годы анализ собственных исследований в рамках проведения экологического мониторинга ГБУ РИАЦЭМ при Министерстве охраны природы РС(Я) показывает, что на территории республики произошло 96 случаев аварийного сброса нефтепродуктов (из них 28 - в 2011 г.; 19 – 2012; 24 – 2013; 25-2014 г.) на территории 27 районов, в том числе 57 случаев при транспортировке, 18 – на стационарных объектах хранения и реализации, 7 - в результате загрязнения воды, связанный с водным транспортом, 2 - разлива на паромной переправе, 1 – при пожаре, 8 - во время рейдовых проверок и 3 загрязнения неустановленного происхождения (рис. 3.1.2).

По количеству поступивших загрязняющих веществ в природные среды их можно характеризовать как мелкие и средние (до 3-10 т).

### **3.2 Изучение остаточного влияния нефтезагрязнений на мерзлотные почвы Амгинского района Республики Саха (Якутия)**

Изучение влияния нефтезагрязнений на микробиологические и агрохимические характеристики мерзлотных почв после восстановительных работ проведены с. Чапчылган Амгинского района, где 7 мая 2009 г. в Амгинской ДЭС произошел разлив около 5 тонн дизельного топлива. Загрязнены нефтепродуктом почва площадью 522,9 м<sup>2</sup> и озеро Халы-Балы. В пробах почвы вне территории ДЭС (загрязненного дизтопливом), при среднем значении фона 0,03 мг/г, превышение содержания нефтепродуктов составило от 94,5 до 265,7 раз. На территории ДЭС (загрязненного дизтопливом), при фоновом значении 0,02 мг/г, превышение содержания нефтепродуктами составило от 71,5 до 3750 раз.

В последующие годы не проводилась оценка рекультивационных работ. Наши исследования проведены в июле 2012 г., т.е. через 3 года после разлива дизельного топлива и восстановительных работ.

По площади загрязнения в соответствии с пунктом 7 ГОСТ 17.4.3.01 – 83 определены 3 пробные площадки с описанием почвенных разрезов. Результаты исследований образцов почвы территории Амгинской ДЭС (площадка 1, у источника загрязнения дизельным топливом в 2009 г., почва заменена грунтом с мелким гравием и мелкоземом) показали повышение рН водного (7,8±0,1), нефтепродуктов (0,064 мг/г или превышение фона в 6 раз), снижение гумуса (2,9±0,1 %), и азота нитратного (табл. 3.2.1). Отмечается высокое содержание актиномицет (5,6x10<sup>3</sup> КОЕ/г), микроскопических грибов (5,1x10<sup>3</sup> КОЕ/г), углеводородокисляющих бактерий (1,5x10<sup>5</sup> КОЕ/г). Относительно малое количество микроорганизмов, использующих минеральные формы азота (3x10<sup>4</sup> КОЕ/г) по сравнению с общим числом бактерий усваивающих органические формы азота (7x10<sup>4</sup> КОЕ/г) в сочетании с низким содержанием гумуса, показывает очень замедленную степень минерализации органического вещества, коэффициент минерализации составляет всего 0,4.

## Обобщенные результаты исследований образцов почвы Амгинской ДЭС

Наименования элементов	Площадка1 (грунт с мелким гравием и мелкоземом)	Площадка2 (мерзлотная дерново-луговая суглинистая почва)	Фон 2 (мерзлотная дерново-остепненная почва)	Площадка3 (мерзлотная дерново-перегнойно-болотная почва)	Фон 3 (мерзлотная перегнойно-луговая почва)
рН-водное	8,2 ±0,1***	7,9±0,6*	7,4±0,1	8,0±0,5	8,3±0,1*
Азот нитратный, мг/100 г	0,1±0,01	0,1±0,01	0,5±0,1***	0,2±0,01*	0,1±0,01
Гумус, %	2,9±0,1	3,4±0,7	4,8±0,3**	3,6±0,2**	3,3±0,1
Нефтепродукты мг/г	0,064	0,03	0,01	0,02	0,01
Общее число бактерий использующих органические формы азота КОЕ/г	7,0x10 <sup>4</sup>	9,7 x10 <sup>4</sup>	1,0 x10 <sup>5</sup>	3,5 x10 <sup>4</sup>	4,0x10 <sup>4</sup>
Аммонифиц, бактерии КОЕ/г	3,0 x10 <sup>4</sup>	8,0 x10 <sup>4</sup>	7,1 x10 <sup>4</sup>	2,0 x10 <sup>4</sup>	3,9 x10 <sup>4</sup>
Спорообразующие бактерии КОЕ/г	4,8 x10 <sup>4</sup>	1,4 x10 <sup>4</sup>	1,3 x10 <sup>4</sup>	9,3 x10 <sup>4</sup>	6,0 x10 <sup>3</sup>
Общее число микроорганизмов использующие минеральные формы азота КОЕ/г	3,0 x10 <sup>4</sup>	5,0 x10 <sup>4</sup>	1,3 x10 <sup>5</sup>	2,0 x10 <sup>4</sup>	3,5 x10 <sup>4</sup>
Актиномицеты КОЕ/г	5,6 x10 <sup>3</sup>	5,0 x10 <sup>2</sup>	8,8 x10 <sup>4</sup>	4,0 x10 <sup>2</sup>	1,2 x10 <sup>2</sup>
Грибы КОЕ/г	5,1 x10 <sup>3</sup>	2,5 x10 <sup>1</sup>	5,0 x10 <sup>1</sup>	-	1,0 x10 <sup>4</sup>
Углекислородфиксирующие бактерии КОЕ/г	1,5 x10 <sup>5</sup>	2,7 x10 <sup>4</sup>	-	-	-
Соотношение микроорганизмов на КАА/МПА	0,4	0,5	1,3	0,6	0,9

Примечание: \*\*\*P>0.001, \*\*P>0.01\* P<0.05

В образцах мерзлотной дерново-луговой суглинистой почвы (площадки №2 - нефтезагрязненная территория вне Амгинской ДЭС, в 100-200 м от источника разлива дизельного топлива), установлено снижение азота нитратного (0,1±0,01 мг/100 г), гумуса (3,4±0,7 %). Содержание нефтепродуктов составляет 0,03 мг/г почвы, что превышает в 3 раза фоновые показатели (0,01 мг/г). Несмотря на довольно высокую микробиологическую активность по общему числу микроорганизмов усваивающих органические формы азота (до 9,7x10<sup>4</sup> КОЕ/г), количеству аммонифицирующих (до 8x10<sup>4</sup> КОЕ/г), спорообразующих (до 1,4x10<sup>4</sup> КОЕ/г), углекислородфиксирующих (до 2,7x10<sup>4</sup> КОЕ/г), отмечается малое количество усваивающих минеральные формы азота (до 5x10<sup>4</sup> КОЕ/г), относительно общего числа микроорганизмов, использующих органический азот (9,7x10<sup>4</sup> КОЕ/г), от этого и исходит низкий показатель интенсивности минерализации органического вещества – 0,5, который заметно уступает аналогичному фоновому показателю – 1,3.

Исследования образцов мерзлотной дерново-перегнойно-болотной почвы (площадки №3 - нефтезагрязненная территория вне Амгинской ДЭС в 200-300 м от источника разлива, на берегу озера Халы-Балы), показали по сравнению с площадкой 1 и 2 (табл. 3.2.1) сравнительно высокое

содержание гумуса ( $3,6 \pm 0,2\%$ ), азота нитратного ( $0,2 \pm 0,01$  мг/100 г). Содержание нефтепродуктов в почве площадки №3 составляет 0,02 мг/г, что в 2 раза превышает фоновые показатели. При микробиологическом исследовании установлено значительное снижение количества общего числа бактерий усваивающих органические ( $3,5 \times 10^4$  КОЕ/г) и минеральные ( $2 \times 10^4$  КОЕ/г) формы азота по сравнению с аналогичными показателями нефтезагрязненных площадок 1 и 2, по коэффициенту минерализации чуть выше – 0,6, но уступает фоновому (0,9). Установленный факт указывает на замедление процессов минерализации азотфиксирующего органического вещества в нефтезагрязненных почвах.

За 3 года после разлива дизельного топлива в Амгинской ДЭС содержание нефтепродуктов в мерзлотных почвах снизилось по сравнению с первоначальными значениями более чем в 1000 раз (почти до фонового уровня), но при этом отмечаются глубокие нарушения в структуре микробиоценозов почв. Микробиологические исследования позволили зафиксировать последствия дизельного топлива, даже в тех случаях, когда аналитическими методами флуометрии содержание нефти (0,03-0,02 мг/г) в 2-3 раза превышает фоновый уровень (0,01 мг/г).

Полученные результаты исследований согласуются с сообщениями В.П. Зволинского с соавт. [2007] и позволяют подтвердить, что нефть попадая в почву, вызывает глубокие нарушения в функционировании микробиоты. Сдвиг, происходящий в составе почвенной биоты, может служить основой для диагностики степени загрязнения и разработки методов реабилитации пострадавших почв.

Таким образом, исследования микробиологической активности в сочетании с аналитическими исследованиями нефтезагрязненных мерзлотно-дерновых остепененных близких к лугово-черноземным почвам, после восстановительных работ, достоверно показали низкую обеспеченность их соединениями азота и замедленный процесс минерализации органического вещества, а также наличие углеродородокисляющих микроорганизмов, при сравнении с фоновыми участками, что может быть использовано при мониторинге эффективности рекультивационных мероприятий.

### **3.3. Исследования штаммов бактерий *Bacillus subtilis***

#### 3.3.1 Изучение физиолого-биохимических свойств бактерий рода *Bacillus* из палеомикрофлоры

По сообщениям литературы бактерии рода *Bacillus* относятся к числу активно углеродородокисляющих микроорганизмов. Для биоремедиации нефтезагрязненных почв и водных объектов особенно в условиях Сибири и Севера, крайне важны и необходимы микроорганизмы обладающие психротрофными и галофильными свойствами. Поэтому одной из задач наших исследований явилось изыскание углеродородокисляющих бактерий рода *Bacillus*, изолированных из палеомикрофлоры и мерзлотных почв.

Как показывают результаты исследований штаммы бактерий обладают типичными свойствами бактерий рода *Bacillus*: аэробы, образуют споры, грам-положительны, подвижны, не образуют глобул, каталазоположительны, большинство оксидазоотрицательны, не разлагают казеин, в основном не вызывают гидролиз крахмала, галофильны: большинство могут расти в присутствии 7% соли, до 10% NaCl отмечен хороший рост штаммов бактерий под №7/2к. Большинство штаммов бактерий могут расти при +4°C. Штаммы бактерий несколько отличаются по биохимическим показателям, что по сообщениям В.В. Смирнова, с соавт. [1982] характерно для видов этого рода. По результатам исследований штамм бактерий №7/2к – отнесен к виду *Bacillus subtilis*, №11 - *Bacillus alvei*, № 6, 10 – *Bacillus pumilus*, №7/хк – *Bacillus brevis*, №7хб – *Bacillus popillae*, остальные 3 штамма бактерий не определены до вида.

При изучении и отборе микроорганизмов – деструкторов нефти и нефтепродуктов, выделенных их различных регионов России, предпочтение дается наиболее активным психротрофным микроорганизмам, способных к деструкции нефти при низких положительных температурах и в присутствии повышенной концентрации соли [Пырченкова и др., 2006].

Таким образом, для дальнейших исследований отобрано 5 штаммов бактерий из палеомикрофлоры: *Bacillus alvei* штамм №11, *Bacillus pumilus* штамм №6, *Bacillus popillae* штамм

№ 7х/б, *Bacillus subtilis* штамм №7/2к, *Bacillus brevis* штамм №7/хк, как психротрофные и обладающие галотолерантными свойствами.

3.3.2 Микроскопические исследования штаммов бактерий *Bacillus subtilis* 7/2к Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 7/2к, как обладающий выраженными галотолерантными и психротрофными свойствами получил название *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к», так как выделен из палеомикрофлоры Колымского шерстистого носорога. Популяции штамма бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к» исследованы с использованием методов сканирующей электронной микроскопии в лаборатории санитарной микробиологии ГНУ ВНИИВСГЭ Россельхозакадемии под руководством д.б.н., профессора И.Б. Павловой.

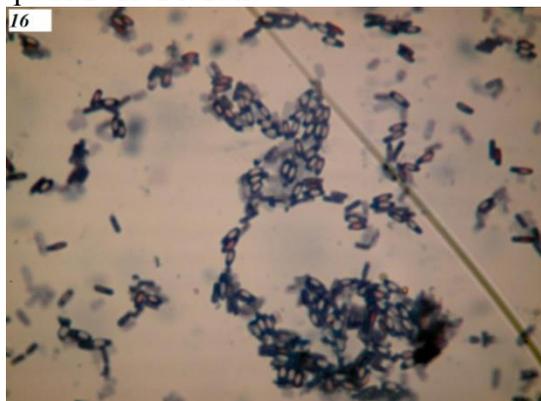


Рис 3.3.2.1 Фрагмент популяции *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к», (МПА, 5 суток) световая микроскопия (x100) (микрофото автора)

Исследование популяции суточной культуры *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к», выращенной на МПБ, выявило рост палочковидных вегетативных клеток, плотно прилегающих друг другу за счет межклеточного матрикса и тонкого слоя наружных покровов. На МПА видно образование колоний, состоящих из плотно прилегающих друг другу длинных клеток, формирующих характерные жгуты. 10-суточные агаровые культуры *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к» представлены в основном спорами. Интересно отметить, что споры, как и вегетативные клетки, располагались в популяции упорядоченно, образуя характерные тяжи в виде «кос», что можно заметить даже в препаратах, окрашенных по Граму, в световом микроскопе, под иммерсией. На МПА – 5 суточная культура *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к», представлена спорами, плотно прилегающих друг к другу, отчетливо просматриваются фрагменты в виде характерных жгутов (рис.3.3.2.1).

3.3.3 Изучение углеводородокисляющих свойств бактерий рода *Bacillus* При изыскании микроорганизмов способных к деструкции нефти исследовано 23 штамма бактерий рода *Bacillus*, среди которых 13 штаммов, выделенных из палеомикрофлоры и 5 штаммов – из мерзлотных почв (все 18 штаммов из коллекции лаборатории по разработке микробных препаратов ФГБНУ ЯНИИСХ), и 5 штаммов бактерий рода *Bacillus*, отобранных в результате собственных исследований.

Для изучения углеводородокисляющих свойств культуры микроорганизмов выращивали на стерильной агаризированной среде (по Макклангу). Также проводили посев микроорганизмов на вышеуказанной среде без агара и с добавлением 4% (от объема среды) нефти и бензина. Аналогично инкубировали при +28°C и +4 °C в течении 1-2 недель. Хороший рост отмечен у 5 культур, при посеве в среду с нефтью и бензином, при +28°C и +4 °C. Рост микроорганизмов на жидкой минерализированной среде с добавлением нефти и бензина определяли пересевом на МПА и изучением физиолого-биохимических свойств. Результаты обобщены в табл. 3.3.3.1

Таблица 3.3.3.1

Способность штаммов бактерий рода *Bacillus* к росту на средах с углеводородами.

Количество исследованных штаммов	Температура инкубирования (°C)	Количество штаммов, способных к росту		
		Среда с парафином (по Макклангу)	Среда с нефтью 4%	Среда с бензином 4%
23	28	10	5	5
23	4	7	5	5

Из 23 исследованных штаммов бактерий рода *Bacillus* способностью окислять парафин обладают 10 штаммов при температуре +28°C и 7 при +4 °C. Из них 5 штаммов бактерий: *Bacillus mycoideas*; *Bacillus subtilis* «ТНП-3»; *Bacillus subtilis* «ТНП-5», выделенные из мерзлотных почв, и *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к», *Bacillus subtilis* «Оймякон 6/1» – из палеомикрофлоры способны расти на жидкой минерализованной среде с 4 % нефти и бензина.

Наиболее выраженной активностью при утилизации бензина обладали *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к» и *Bacillus subtilis* «Оймякон 6/1» (из коллекции лаборатории). При чем, *Bacillus Subtilis* «Оймякон 6/1» быстрее утилизировал при +4 °C, *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к» при +28°C.

3.3.4. Изучение эмульгирующей активности штаммов бактерий рода *Bacillus* Мощным регулятором активности микробной популяции, в том числе природной, являются поверхностно-активные вещества (ПАВ), в частности ПАВ микробного происхождения [Gutnick et. al, 1987; Ron et. al, 2002; Карпенко и др., 2006]. За отсутствием спектрального метода анализа ПАВ, именно для оценки поверхностно-активных свойств микроорганизмов используется показатель эмульгирующей активности, который основывается на свойстве ПАВ образовывать эмульсию при встряхивании культуральной среды или клеток микроорганизмов с углеводородом или нефтью [Назина и др., 2003].

Эмульгирующую активность определяли по методу D.L. Gutnick [1987], описанному в работе Е.В. Карпенко [2006]. В качестве субстрата для эмульгирования использовали керосин, толуол. Исследовали эмульгирующую активность культуральных жидкостей штаммов бактерий: *Bacillus mycoideas*, *Bacillus subtilis* «ТНП-3», *Bacillus subtilis* «ТНП-5», *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к», *Bacillus subtilis* «Оймякон 6/1». Также *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к», *Bacillus subtilis* «Оймякон 6/1», выращенные на среде с бензином при 4 и 28°C (рис 3.3.4.1).

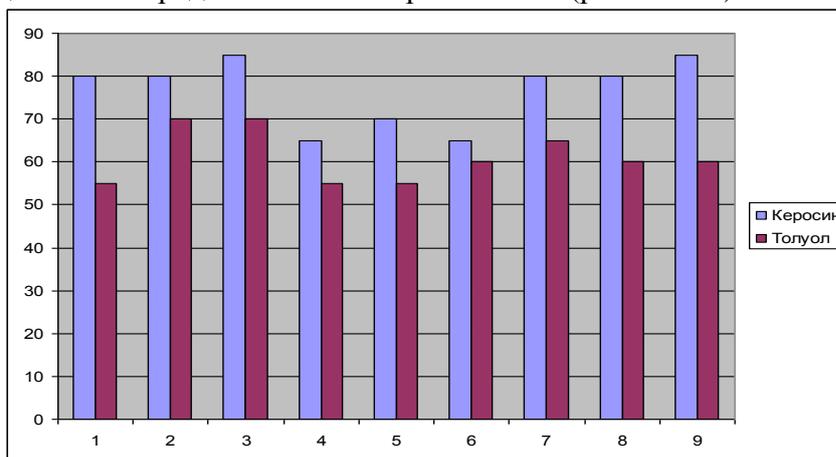


Рис 3.3.4.1 Эмульгирующие свойства поверхностно-активных веществ, синтезируемых штаммов бактерий рода *Bacillus*. Субстрат для эмульгирования: керосин, толуол.

1 – *Bac. mycoideas*; 2 – *Bac. subtilis* «ТНП-3»; 3 - *Bac. subtilis* «ТНП-5»; 4 - *Bac. subtilis* 7/2к; 5 - *Bac. subtilis* 7/2к– выращенная на среде с бензином при температуре +28°C; 6 - *Bac. subtilis* 7/2к – выращенная на среде с бензином при температуре +4°C; 7 - *Bac. subtilis* 6/1; 8 - *Bac. subtilis* 6/1 - выращенная на среде с бензином при температуре +28°C; 9 - *Bac. subtilis* 6/1 - выращенная на среде с бензином при температуре +4°.

Как показали полученные данные, индекс эмульгирования составляет от 55 до 85 %, следовательно исследуемые культуральные жидкости штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенные их мерзлотных почв и палеомикрофлор обладают эмульгирующими свойствами.

Таким образом, наши результаты согласуются с данными литературы [Lin, 1996; Ron et. al., 2001; Lu et. al., 2003; Назина и др., 2003], что штаммы бактерий рода *Bacillus* продуцируют эффективные био-ПАВы и могут быть использованы для очистки экосистем от нефтезагрязнений.

3.3.5 Изучение антифунгальной и фитотоксической активностей штаммов бактерий *Bacillus subtilis* Для современных биопрепаратов особенно для восстановления агроценозов после антропогенных воздействий очень важна полифункциональность, т.е. кроме основного действия ценно сочетание антифунгальной и ростстимулирующих активностей.

Фитотоксическая активность штаммов бактерий *Bacillus subtilis* Фитотоксическую активность штаммов бактерий *Bacillus subtilis* исследовали методом однократного опрыскивания (до замачивания) семян овсяницы красной сорта «Мюрюнская» суспензией штаммов бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма – 7/2к» и *Bacillus subtilis* «Оймякон – 6/1», из расчета  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл. В контроле использовали воду. Обработанные семена проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге при комнатной температуре (20-24°C), по 50 штук семян в 3 вариантах, в 4-х повторностях. Учитывали энергию прорастания (на 7 день) и всхожесть семян (на 14 день).

Как показали результаты исследований (табл. 3.3.5.1) штаммы бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма – 7/2к» и *Bacillus subtilis* «Оймякон – 6/1», не являются токсичными для проростков Овсяницы красной. При этом штамм бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма – 7/2к», не оказал фитотоксического и заметного ростстимулирующего действия. Токсичными считаются культуры микроорганизмов, вызывающие подавление жизнедеятельности растений более чем на 25 % [Сираева с соавт., 2004]. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* «Оймякон – 6/1», заметно стимулировал энергию прорастания (на 5,8%) и всхожесть овсяницы красной сорта «Мюрюнская» (на 6,4%), по сравнению с контролем.

Таблица 3.3.5.1

Энергия прорастания и всхожесть семян Овсяницы красной, обработанной суспензией штаммов бактерий *Bacillus subtilis* (в дозе  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл)

№	Вид штамма бактерий	Овсяница красная Мюрюнская	
		Энергия прорастания, %	Всхожесть, %
1	<i>Bac. subtilis</i> «Колыма – 7/2к»	43,5±0,1	47,5±0,1
2	<i>Bac. subtilis</i> «Оймякон – 6/1»	52,0±0,1 ***	60,0±0,1 ***
3	Контроль (вода)	46,2±0,1	53,6±0,1

Примечание: \*\*\*P>0.001

Антифунгальная активность штаммов бактерий *Bacillus subtilis* В качестве тест-культур использовали 10-суточные культуры микроскопических грибов: *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Candida sp.*, выделенные из сена, и *Botrytis cineria* - из земляники.

Антифунгальную активность штаммов бактерий *Bacillus subtilis* изучали методом диффузии в агар в чашках Петри. Для этого использовали их культуральную жидкость (КЖ), которую получали в результате фильтрации и центрифугирования 5 суточных культур, выращенных на мясо-пептоном бульоне. Контролем служила среда без добавления указанных штаммов бактерий. Антифунгальную активность рассчитывали по формуле Аббота:

Степень ингибирования роста колоний гриба  $\times 100$ ,  
 где  $D_k$  и  $D_o$  – диаметр колонии гриба соответственно в контроле и опыте, в см.

Таблица 3.3.5.2

Антифунгальная активность штаммов бактерий *Bacillus subtilis*

№	Микроскопические грибы	Подавление роста, %			
		ТНП-3	ТНП-5	Колыма 7/2к	Оймякон 6/1
1	<i>Asp. niger</i>	90	90	100	85
2	<i>Botrytis cineria</i>	95	100	100	100
3	<i>Candida sp.</i>	100	95	100	100
4	<i>Fus. oxysporum</i>	100	100	100	100

Примечание: Подавление роста рассчитано по формуле Аббота.

Как показывают данные табл. 3.3.5.2 штаммы бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к», *Bacillus subtilis* «Оймякон 6/1» обладают антифунгальной активностью по отношению к грибам: *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Candida sp.*, *Botrytis cineria*. Испытуемые штаммы бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к», *Bacillus subtilis* «Оймякон 6/1», по антифунгальной эффективности оказались чуть активнее эталонных пробиотических штаммов бактерий *Bacillus subtilis* «ТНП-3» и *Bacillus subtilis* «ТНП-5».

Следует отметить, что выраженной антифунгальной активностью обладал штамм бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к». Таким образом, результаты проведенных опытов показали антифунгальную и ростостимулирующую активность штаммов бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к», *Bacillus subtilis* «Оймякон 6/1» и перспективность их дальнейшего изучения для разработки биопрепаратов широкого применения.

### 3.4. Микровегетационные опыты с использованием штаммов бактерий *Bacillus subtilis* при биоремедиации нефтезагрязненных почв

#### 3.4.1. Результаты лабораторных опытов по биоремедиации нефтезагрязненных почв

Испытаны в качестве нефтедеструкторов 4 штамма бактерий рода *Bacillus*: *Bacillus mycoideas*, *Bacillus subtilis* «ТНП-3», *Bacillus subtilis* «ТНП-5», *Bacillus subtilis* «Оймякон 6/1» и их сочетания. Поставлены лабораторные опыты, проведенные на стерильном почвенном субстрате, которые загрязняли талаканской нефтью из расчета 50 мг/г. В опыте использовали деревянные ящики размером 20х20х20 см., одинаково заполненные супесчаной почвой, загрязненной нефтью (кроме контроля). Почва загрязненная нефтью обрабатывалась суспензией выше указанных культур микроорганизмов из расчета  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл, при расходе 1 л/м<sup>2</sup> поверхности (кроме контроля). Контроли обрабатывались стерильной водой.

В качестве биотеста, характеризующего степень рекультивации, а также возможного активного агента фиторекультивации, после обработки бактериальной суспензией, высевали семена районированной овсяницы красной сорта «Мюрюнская», из расчета 0,1 г/0,04 м<sup>2</sup> или 50 штук семян на каждую емкость. Опыт поставлен в 7 вариантах, 3-х повторностях.

Варианты опыта:

1. Почва + нефть + шт. *Bac. subtilis* «ТНП-3» + посев овсяницы красной;
2. Почва + нефть + шт. *Bac. subtilis* «ТНП-5» + посев овсяницы красной;
3. Почва + нефть + шт. *Bac. mycoideas* + посев овсяницы красной;
4. Почва + нефть + шт. *Bac. subtilis* «Оймякон-6/1» + посев овсяницы красной;
5. Почва + нефть + смесь штаммов *Bac. subtilis* «ТНП-5», *Bac. subtilis* «ТНП-3», *Bac. subtilis* «Оймякон-6/1», *Bac. mycoideas* + посев овсяницы красной;
6. Почва + нефть + посев овсяницы красной;
7. Почва + посев овсяницы красной (контроль)

По результатам химических анализов почвы содержание нефтепродуктов в почве, искусственно контаминированной нефтью из расчета 50,0 мг/г, за 7 месяцев рекультивации с применением спорообразующих аэробных бактерий рода *Bacillus* в сочетании посевом овсяницы красной сорта «Мюрюнская», снизилось до 0,24 – 0,076 мг/г. При применении только фиторекультивации, содержание нефтепродуктов доходит до 0,355 мг/г. По результатам наблюдений можно заключить, что районированный сорт «Мюрюнская» овсяницы красной -нефетолерантное растение, т. е. может расти в присутствии нефти (до 50мг/г), что предполагает возможность испытания при фиторекультивации нефтезагрязненных почв в условиях Якутии.

3.4.2 Результаты полевых опытов по биоремедиации нефтезагрязненных почв Полевые опыты поставлены на мерзлотной лугово-черноземной почве пригорода Якутска (62°09'08.7"N 129°39'42.9"E) в 8 вариантах, в 3-х повторностях. Опыты начаты в середине июня. В качестве органического носителя нефтеоксилирующих бактерий использовали птичий помет из расчета 15 т/га, или 375 г/0,5 м<sup>2</sup>. В качестве нефтеоксилирующих микроорганизмов использовали, суспензии штаммов бактерий *Bacillus subtilis* «Оймякон 6/1» и *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к», в дозе 5 × 10<sup>9</sup> КОЕ/мл, которые наносили методом мелкокапельного распыления на птичий помет из расчета 250-500 мл. на 1 м<sup>2</sup>. Так же использовали птичий помет после применения в рацион курам-несушкам пробиотика «Норд-Бакт» из штаммов *Bacillus subtilis* «ТНП-3» и «ТНП-5» (из расчета 5x10<sup>7</sup> КОЕ/гол птицам ежедневно в течение 10 дней, каждые 2 месяца подряд).

Варианты опыта:

1. Нефть + птичий помет;
2. Нефть + птичий помет после применения птицам пробиотика из штаммов бактерий *Bacillus subtilis* «ТНП-3» и *Bacillus subtilis* «ТНП-5»;
3. Нефть + птичий помет + суспензия штамма *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к» (500мл);
4. Нефть + птичий помет + суспензия штамма *Bacillus subtilis* Оймякон 6/1(500мл);
5. Нефть + птичий помет + суспензия штаммов *Bacillus subtilis* «Оймякон 6/1» и *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к» (по 250 мл);
6. Нефть + суспензия штамма *Bacillus subtilis* «Колыма7/2к» (250мл);
7. Нефть + суспензия штамма *Bacillus subtilis* «Оймякон 6/1» (250мл);
8. Нефть (контроль)

С 1-5 варианты были перекопаны и посажена в качестве биотеста овсяница красная сорт «Мюрюнская».

Во всех вариантах после загрязнения нефтью, в течение лета не наблюдалось роста растений, кроме редкого роста посаженной овсяницы. Полученные результаты показывают, что в полевых опытах применено значительное загрязнение нефтью: до 135,143мг/г, что оказывало ингибирующее воздействие на рост растений, включая биотест – овсяницу красную. Следует отметить, что у всех вариантов (с 1 по 7), обработанных птичьим пометом и микроорганизмами к концу летнего периода не установлено запаха нефтепродуктов, в отличие от контроля (вариант 8).

По результатам химических исследований почвы, загрязненных нефтью из расчета 135,5±0,3 мг/г, (взятых в конце сезона: в сентябре месяце) за три месяца ремедиации с применением спорообразующих аэробных бактерий *Bacillus subtilis* в дозе 5×10<sup>9</sup> КОЕ/мл при расходе 250 – 500 мл/м<sup>2</sup>, инокулированных на птичьем помете (из расчета 15 т/га) и без него, как показывает данные табл. 3.4.2.1, содержание нефтепродуктов в почве снизилось до 0,64-102,8 мг/г. В незагрязненной почве рядом с опытным участком содержание нефтепродуктов составило – 1,5±0,1 мг/г

Высокая эффективность достигнута при применении суспензии штаммов бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к» из расчета 250 мл/м<sup>2</sup>, деструкция нефти за три месяца достигла до 0,64±0,1 мг/г или составила 99,53 %, а использование в сочетании в птичьим пометом привело к снижению уровня загрязнения нефтепродуктами до 2,2±0,1 мг/г или – 98,32 %.

Применение суспензии штаммов бактерий *Bacillus subtilis* «Оймякон 6/1» снижает содержание нефтепродуктов в почве на 23,8%, а в сочетании с птичьим пометом на 53,26%. Менее выраженная эффективность штаммов бактерий *Bacillus subtilis* «Оймякон 6/1», по сравнению с

*Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к» в очищении нефтезагрязнения, возможно связана с тем, что опыты поставлены в полевой сезон: июнь-июль-август – самые жаркие месяцы в Якутии (средняя температура +28<sup>0</sup>С). Как показали предыдущие исследования штамм бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма7/2к» более эффективно утилизировал углеводороды при температуре 28<sup>0</sup>С, а штамм бактерий *Bacillus subtilis* «Оймякон 6/1» более активно «работал» при низких положительных температурах (+4<sup>0</sup>С).

Таблица 3.4.2.1

Результаты аналитических работ по количественному определению нефти в почвенных пробах

№	Условия опыта	Содержание НП мг/г (M±m)	Снижение уровня загрязнения в %
1	Нефть+птичий помет без обработки	84,3±0,1	37,6
2	Нефть+птичий помет после применения пробиотика	2,6±0,1	98,07
3	Нефть+птичий помет + суспензия штамма <i>Bacillus subtilis</i> «Колыма 7/2к» (500 мл)	2,2±0,1	98,32
4	Нефть+птичий помет + суспензия штамма <i>Bacillus subtilis</i> «Оймякон 6/1» (500 мл)	63,1±0,1	53,26
5	Нефть+птичий помет + суспензия штамма <i>Bacillus subtilis</i> «Оймякон 6/1» и «Колыма 7/2к» (по 250 мл)	0,84±0,2	99,38
6	Нефть+ суспензия штамма <i>Bacillus subtilis</i> «Колыма 7/2к» (250 мл)	0,64±0,1	99,53
7	Нефть+ суспензия штамма <i>Bacillus subtilis</i> «Оймякон 6/1» (250 мл)	102,8±0,2	23,8
8	Нефть (контроль)	135,2±0,3	0,3
9	Контроль почва без нефти Не загрязненная нефтью почва	1,5±0,1	-

Как показывают данные таблицы 3.4.2.1 степень деструкции нефти выше у штамма бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к» и его сочетаний. При применении сочетания штаммов бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к» и *Bacillus subtilis* «Оймякон 6/1» с птичьим пометом, содержание нефтепродуктов снизилось до 0,84±0,2 мг/г или деструкция нефти составила 99,38 %. Это может быть следствием того, что микроорганизмы – деструкторы, входящие в состав ассоциации, способны разлагать различные фракции нефти, поэтому эффективность деструкции при их совместном применении увеличивалась.

Следует отметить, что при применении птичьего помета (из расчета 15 т/га) деструкция нефти за три месяца составила 37,6 %, а при использовании птичьего помета от кур, в рациионе, которых применяли пробиотик «Норд-Бакт» (на основе штаммов бактерий *Bacillus subtilis* «ТНП-3» и «ТНП-5») соответственно составляет 98,07 %.

Нами впервые установлены углеводородокисляющая и эмульгирующая активности у пробиотических штаммов бактерий *Bacillus subtilis* «ТНП-3» и *Bacillus subtilis* «ТНП-5». Обобщение полученных результатов позволяет заключить перспективность использования птичьего помета в восстановлении нефтезагрязненных почв, после применения птицам пробиотика на основе штаммов бактерий *Bacillus subtilis* «ТНП-3» и *Bacillus subtilis* «ТНП-5».

После загрязнения почвы нефтью резко возрастает (в 53,6 раза) общее микробное число, совершенно исчезают споровые формы спорообразующих аэробных бактерий. На МПА, используемой для определения общего микробного числа, обнаружены грамположительные подвижные палочки, которые в последующем образовывали споры, и обладали свойствами

типичными для спорообразующих аэробных бактерий рода *Bacillus*. Бактерии рода *Bacillus* находятся в почве в зависимости от условия существования либо в состоянии спор, или в вегетативной фазе роста. При исчерпывании запасов легко подвижных органических веществ значительное количество вегетативных клеток бацилл образует споры. Обогащение почвы свежими формами органических соединений вызывает переход спор в вегетативные клетки [Мишустин, Мирзоева, 1965].

Таким образом, при нефтяном загрязнении совершенно исчезли спорообразующие аэробные бактерии в споровой (покоящийся) форме и одновременно резко увеличилось количество этих бактерий в вегетативной фазе. Как известно, спорообразующие аэробные бактерии активно продуцируют биологически активные вещества (БАВы) в вегетативной фазе роста [Смирнов с соавт., 1980]. Следовательно, после загрязнения нефтью, в почве резко возрастает количество бактерий рода *Bacillus* в активной вегетативной форме. Полученные результаты исследований позволяют предположить, что спорообразующие аэробные бактерии рода *Bacillus*, которые доминируют в микробиоценозе мерзлотных почв обладают углеводородокисляющими свойствами и участвуют в процессе самоочищения мерзлотных почв от нефтяных загрязнений. Исходя из результатов полевых опытов можно заключить, что дополнительное введение эффективных, аборигенных углеводородокисляющих бактерий рода *Bacillus* не только усилило, но и ускорило естественный процесс самоочищения почвы от нефти.

## ВЫВОДЫ

1. На территории Республика Саха (Якутия), за период с 2008-2014 гг. установлено 182 аварийных разливов нефтепродуктов, которые по количеству поступивших загрязняющих веществ в природные среды, характеризуются как мелкие и средние (до 3-10 т). Наиболее часто загрязнения нефтепродуктами происходят при их транспортировке, что составляет 68,8% случаев от общего числа нефтезагрязнений.

2. Установлено, что в нефтезагрязненных мерзлотных дерново-остепненных близких к лугово-черноземным почвах, после восстановительных работ (через 3 года) при остаточном содержании нефтепродуктов в пределах 0,02-0,06 мг/г (фон – 0,01 мг/г) наблюдаются изменения в структуре микробиоценозов: наличие углеводородокисляющих микроорганизмов (до  $2,7 \times 10^5$  КОЕ/г), увеличение количества бактерий, усваивающих органические формы азота, при одновременном уменьшении числа бактерий утилизирующих минеральные формы азота, снижение содержания гумуса и замедленная степень минерализации органического вещества (коэффициенты минерализации в нефтезагрязненных почвах – 0,4-0,6, фон – 0,9-1,3).

3. Из 23 исследованных штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из мерзлотных почв и палеомикрофлоры, выявлены штаммы бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к», *Bacillus subtilis* «Оймякон 6/1», *Bacillus subtilis* «ТНП-3», *Bacillus subtilis* «ТНП-5», *Bacillus mycoideas*, способные к деструкции нефти. Из них штаммы бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к» и *Bacillus subtilis* «Оймякон 6/1», изолированные из палеомикрофлоры - галофильные психротрофы, обладают выраженным сочетанием углеводородокисляющих (при температуре - +4°C и +28 °C), эмульгирующих (индекс эмульгирования от 55 -85%), антифунгальных свойств по отношению к грибам *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytius cineria*, *Candida sp.*, и не фитотоксичны.

4. Установлено возможность применения овсяницы красной сорт «Мюрюнская» при фиторекультивации нефтезагрязненных (не более 50мг/г) мерзлотных почв.

5. Разработан эффективный способ биоремедиации нефтезагрязненных мерзлотных почв с применением суспензии штаммов бактерий *Bacillus subtilis* «Колыма 7/2к» из расчета  $5 \times 10^9$  КОЕ/мл при расходе 250 мл на 1 м<sup>2</sup> поверхности. Деструкция нефти за три летних месяца достигает 99,53%.

6. Установлены углеводородокисляющие (при температуре +4°C, +28°C) и эмульгирующие (индекс эмульгирования 70-85%) активности пробиотических штаммов бактерий *Bacillus subtilis* «ТНП-3» и *Bacillus subtilis* «ТНП-5». Использование птичьего помета (15 т/га) от

кур-несушек, в рацион которых введен пробиотик на основе указанных штаммов, эффективно при биоремедиации нефтезагрязненных мерзлотных почв. Деструкция нефти в почве составляет 98,07%.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Неустроев М.М.** Изыскание нефтеокисляющих штаммов бактерий рода *Bacillus* и использование их в биотехнологии// Матер-лы IX международ. симпозиума по развитию холодных регионов ISCORD-2010. – Якутск, 2010. – С.217.
2. Неустроев М.П. Способ очистки мерзлотных почв от нефти спорообразующими бактериями *Bacillus subtilis*/ М.П. Неустроев, Н.П.Тарабукина, **М.М. Неустроев**, Н.Н.Сазонов, С.И.Парникова, А.М.Степанова// Патент РФ №2446900, опубликован 10.04.2012. Бюл. №10.-3с
3. Tarabukina N.P. Yakutiya zoolite microflora/ N.P. Tarabukina, M.P. Neustroev, M.P. Fedorova, S.I. Parnikova, **M.M. Neustroev**// International journal of the French Guaternary association – 2010, №3. – P. 59-60
4. Сазонов Н.Н. Использование фиторекультивации в сочетании со штаммами бактерий *Bacillus subtilis* для восстановления нефтезагрязненных почв/ Н.Н.Сазонов, **М.М.Неустроев**// Перспективы фитобиотехнологии для улучшения качества жизни на севере. – Якутск. 2010. – С.148-150
5. **Неустроев М.М.** Антифунгальная активность штаммов бактерий *Bacillus subtilis*, изолированных из представителей мамонтовой фауны// Сб. трудов Всероссийской научно-практич. Конференции с элементами научной школы для молодежи. «Живые системы и конструкционные материалы в условиях крилитозоны», Якутск, 2011.- С.92-95
6. **Неустроев М.М.** Разработка биологического способа восстановления нефтезагрязненных мерзлотных почв// Наука и образование. – 2013. №1(69)-С.93-97
7. Олесова А.И. Загрязнение окружающей среды в результате аварийных ситуаций на территории Республики Саха (Якутия) за 7 месяцев 2013 года / А.И. Олесова, **М.М. Неустроев** // Экологический мониторинг / ежеквартальный бюллетень – 2013 – Вып. 14. – С. 24-27.
8. **Неустроев М.М.** Способ очистки мерзлотных почв от нефти спорообразующими бактериями *Bacillus subtilis* / М.М. Неустроев // Современные проблемы мерзлотного почвоведения и прикладной экологии Севера: материалы Всероссийской научно-практической конференции (с международным участием), посвященной 80-летию доктора биологических наук, академика АН РС (Я), заслуженного деятеля науки Российской Федерации, профессора Саввинова Д. Д. 23-30 марта 2012 г. – Якутск: издательский дом СВФУ, 2013. – С. – 142-143.
9. Neustroev M.P. Mammoth microfloras preserved in Yakutia permafrost / M.P. Neustroev, N.P. Tarabukina, P.A. Lazarev, M.P. Fedorova, S.I. Parnikova, **M.M. Neustroev**, I.B. Pavlova, A.M. Stepanova, A.A. Baichev // Abstract Book of the VI-th International Conference on Mammoths and their Relatives. S.A.A.G., Special Volume 102:139.
10. Неустроев М.П. Способ биоремедиации нефтезагрязненных мерзлотных почв / М.П. Неустроев, **М.М., Неустроев** Н.И. Сазонов, А.М. Степанова, Н.П. Тарабукина, С.И. Парникова // Патент № 2538125, опубликован 10.01.2015 г.- Бюл. № 1. – 3 с.
11. Neustroev M.P. Microflora of Fossil Animals Preserver in Yakut Permafrost / M.P. Neustroev., **M.M. Neustroev**, N.P. Tarabukina, M.P. Fedorova, A.M. Stepanova, S.I. Parnikova, A.A. Baichev // Earth Science and Engineering (USA) – 2014 – P 484-489.
12. Тарабукина Н.П. Влияние нефтезагрязнений на микробиоту мерзлотной таежной дерново-карбонатной суглинистой почвы / Н.П. Тарабукина, М.П. Неустроев, Д.Д. Саввинов, **М.М. Неустроев**, А.М. Степанова, С.И. Парникова // Материалы 4- го международного совещания / Сохранение лесных генетических ресурсов Сибири – Барнаул – 2015 – С. 166-168.
13. Тарабукина Н.П. Перспективность использования птичьего помета для биоремедиации нефтезагрязненных мерзлотных почв / Н.П. Тарабукина, А.М. Степанова, **М.М. Неустроев**, С.И.

Парникова, М.П. Неустроев // ВНИИВСГЭ Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии – 2015. - № 3 (15) – С. 85-87.