

На правах рукописи



ХМЕЛЕВЦОВА ЛЮДМИЛА ЕВГЕНЬЕВНА

**ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОЧВ И ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ
ИМПАКТНОЙ ЗОНЫ НОВОЧЕРКАССКОЙ ГРЭС С ПОМОЩЬЮ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ LUX-БИОСЕНСОРОВ**

03.02.08 – экология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ростов-на-Дону – 2018

Работа выполнена в лаборатории экологии и молекулярной биологии микроорганизмов Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Южный федеральный университет»

- Научный руководитель:** **Сазыкин Иван Сергеевич,**
кандидат биологических наук,
ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет»,
лаборатория экологии и молекулярной биологии
микроорганизмов, ведущий научный сотрудник
- Официальные оппоненты:** **Кацев Андрей Моисеевич,**
доктор биологических наук, профессор,
ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет
им. В.И. Вернадского», кафедра медицинской и
фармацевтической химии Медицинской Академии
им. С.И. Георгиевского, заведующий
- Ашихмина Тамара Яковлевна,**
доктор технических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Вятский государственный
университет», главный научный сотрудник
- Ведущая организация:** **ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет», г. Казань**

Защита диссертации состоится **21 декабря 2018 г. в 17:00** на заседании диссертационного совета Д 212.208.32 по биологическим наукам при Южном федеральном университете по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1, ЮФУ, к. 603.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке им. Ю.А. Жданова Южного федерального университета по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, ул. ул. Р. Зорге, 21Ж и на сайте <http://hub.sfedu.ru/diss/>.

Объявление о защите и текст автореферата размещен на официальном сайте Южного федерального университета www.sfedu.ru и на сайте Министерства образования и науки Российской Федерации www.vak.ed.gov.ru.

Отзывы на автореферат в 2-х экз., заверенные печатью, просим направлять по адресу: 344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1, к.803а, ученому секретарю совета Д212.208.32 Акименко Ю.В. e-mail: jvakimenko@sfedu.ru.

Автореферат разослан « » ноября 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Акименко Юлия Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Развитие промышленного комплекса юга России, кроме очевидных экономических и социальных преимуществ, влечет за собой и неблагоприятные последствия для окружающей среды региона. Техногенные катастрофы, такие как аварии на предприятиях нефтяной промышленности, крушения танкеров и т.д., а также загрязнения в процессе штатного функционирования различных объектов топливно-энергетического комплекса, металлургической и нефтехимических отраслей, автомобильных дорог приводят к накоплению различных поллютантов в окружающей среде, оказывая негативное влияние на здоровье и качество жизни населения.

Методы оценки загрязнения окружающей среды, применяемые в настоящий момент, весьма разнообразны. Среди них выделяются методы биотестирования с применением цельноклеточных бактериальных биосенсоров. Данные методы отличаются высокой чувствительностью, производительностью, экспрессностью и биологической адекватностью в сочетании с экономической эффективностью. В качестве биологической части таких биосенсоров используются как природные штаммы люминесцентных микроорганизмов, так и генно-инженерные штаммы, в которых гены-репортеры поставлены под контроль различных, как правило, индуцируемых токсикантами, промоторов. Природные микроорганизмы применяют для оценки интегральной токсичности загрязненных сред. Генно-инженерные штаммы чаще применяют для оценки групп поллютантов, повреждающих те или иные компоненты клетки, либо оказывающие специфическое токсическое воздействие. Так, например, существуют цельноклеточные бактериальные биосенсоры, реагирующие на повреждение ДНК, белков, клеточных мембран и т.д. С другой стороны, сконструированы биосенсорные штаммы, дающие ответ на вещества, вызывающие в клетке окислительный стресс – усиление генерации супероксид-анион радикала, оксида азота или повышенную концентрацию пероксида водорода. Использование цельноклеточных бактериальных биосенсоров для экотоксикологической оценки загрязненных территорий - весьма перспективное и активно развивающееся направление.

Одним из наиболее эффективных и экономически выгодных способов очистки загрязненных почв является биоремедиация с использованием микроорганизмов-деструкторов (Chan, 2011).

Для успешного проведения микробиологической ремедиации необходим тщательный подбор штаммов, так как каждая почва со своими физическими, химическими, микробиологическими параметрами представляет собой индивидуальную, живую, меняющуюся систему. При этом актуальной задачей является исследование как самих загрязненных территорий, так и механизмов, лежащих в основе процессов микробной трансформации и утилизации загрязняющих веществ.

Целью данного исследования является изучение экотоксикологических параметров почв и донных отложений импактной зоны НчГРЭС с помощью бактериальных lux-биосенсоров.

Для достижения цели исследования были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить токсичность почв и донных отложений импактной зоны Новочеркасской ГРЭС с помощью батареи цельноклеточных бактериальных lux-биосенсоров *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245, *E. coli* MG1655 (pRecA-lux), *E. coli* MG1655 (pKatG-lux), *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux) и *E. coli* MG1655 (pIbpA-lux).

2. Выявить точки отбора проб почв, обладающих наибольшим уровнем токсичности.

3. Сопоставить показатели токсичности, полученные с помощью lux-биосенсоров, и литературные данные результатов химического анализа ПАУ.

4. Выделить и идентифицировать микроорганизмы - потенциальные деструкторы ПАУ из почв и донных отложений НчГРЭС.

Основные положения:

1. 66,7 % проб почв и 100 % проб донных отложений импактной зоны Новочеркасской ГРЭС обладают высокой интегральной токсичностью, определенной с помощью люминесцентного сенсорного штамма *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245, а также содержат генотоксиканты промутагенной природы, прооксиданты и вещества, повреждающие клеточные белки.

2. Наиболее токсичными, по результатам трехлетнего исследования с помощью биосенсорного анализа, являются почвы, отобранные в точках 1, 3, 7, 11, находящиеся в непосредственной близости к Новочеркасской ГРЭС.

3. Выявлена положительная корреляционная зависимость между интегральной токсичностью почв, определенной с помощью штамма *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245, и содержанием в них нафталина. Отрицательная корреляция зарегистрирована между удаленностью точки от Новочеркасской ГРЭС и показателями токсичности, определенными с помощью биосенсоров *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245 и *E. coli* MG1655 (pIbpA-lux).

4. Основными представителями культивируемых ПАУ-деградирующих микроорганизмов загрязненных почв и донных отложений импактной зоны Новочеркасской ГРЭС являются бактерии родов *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*.

Научная новизна

С помощью биосенсорного анализа исследованы такие экотоксикологические показатели почв окрестностей Новочеркасской ГРЭС, как общая (интегральная) токсичность, генотоксичность, прооксидантные свойства, наличие повреждающих белки веществ.

Изучено изменение уровня токсичности и генотоксичности почв и донных отложений импактной зоны Новочеркасской ГРЭС с 2013 по 2015 год.

Выявлены корреляционные зависимости между показателями токсичности, определенными с помощью lux-биосенсоров, и результатами химического анализа содержания ПАУ в исследуемых почвах донных отложениях.

Показана корреляционная зависимость между показателями токсичности, определенными с помощью lux-биосенсоров, и расстоянием до Новочеркасской ГРЭС.

Выделены и идентифицированы культивируемые формы ПАУ-деградирующих бактерий микробоценозов импактной зоны Новочеркасской ГРЭС.

Показана генерация супероксид анион-радикала и пероксида водорода штаммами ПАУ-деградирующих микроорганизмов при инкубации с различными углеводородами.

Практическая значимость

Экотоксикологические исследования с использованием батареи цельноклеточных бактериальных lux-биосенсоров, реагирующих на различные группы поллютантов, способствуют внедрению этой технологии в практику экотоксикологического мониторинга окружающей среды и биологически адекватной оценке механизмов токсического действия различных поллютантов и их смесей на биологические объекты.

Выделенные из почв и донных отложений импактной зоны Новочеркасской ГРЭС культивируемые штаммы ПАУ-деградирующих бактерий могут найти непосредственное применение в биоремедиации загрязненных углеводородами территорий.

Полученные знания об участии активных форм кислорода в процессе биотрансформации углеводов можно использовать для отбора перспективных в биоремедиации штаммов микроорганизмов.

По результатам поведенных исследований зарегистрированы две электронных базы данных, которые могут быть использованы при проведении экотоксикологического мониторинга окружающей среды.

Данные по загрязнению исследованных почв и донных отложений могут быть востребованы санитарными и экологическими службами ЮФО.

Материалы работы используются при чтении лекций и проведении практических занятий по курсам «Микробиология с основами биотехнологии», «Микробные трансформации».

Личный вклад автора. Тема, цель, задачи, объекты и методика проведения диссертационного исследования определены автором совместно с научным руководителем. Все экспериментальные работы проведены лично автором. Анализ полученных результатов, формулировка выводов и основных защищаемых положений выполнены автором работы при корректирующем участии научного руководителя. По теме диссертационного исследования автором или научным коллективом с участием автора опубликовано 36 научных работ (8,787 п.л.). Личный вклад автора составил 3,6 п.л.

Апробация работы. Результаты диссертационного исследования были доложены на научно-практической конференции на базе Южного федерального университета «Миссия молодежи в науке» (г. Ростов-на-Дону, 2012), Второй Всероссийской научной конференции (с международным участием) «Окружающая среда и устойчивое развитие регионов» (г. Казань, 2013), V Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (г. Ростов-на-Дону, 2013г.), VI Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (г. Ростов-на-Дону, 2015 г.), Всероссийском семинаре с международным участием «Радиационная и промышленная экология», (г. Ростов-на-Дону, 2016), VIII Международной научно-практической конференции «Экологические проблемы. Взгляд в будущее» (БП и СОТ «Витязь» - БП и СОТ «Лиманчик», 8-11 сентября 2017 г.).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 36 работ, из них 3 работы в изданиях из перечня ВАК; 5 - в изданиях, индексируемых в библиографических базах данных Scopus и Web of Science; 2 базы данных.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 3 глав, выводов, списка литературы. Работа изложена на 150 страницах машинописного

текста, содержит 12 таблиц, 39 рисунков. Список использованной литературы включает 207 источников, в том числе 156 на иностранных языках.

Конкурсная поддержка работы. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, РФФИ, ЮФУ в рамках следующих проектов: проект № 1894 (213.01-11/2014-33), выполняемый в рамках базовой части государственного задания Министерства образования и науки РФ «Биомониторинг состояния экосистем Азово-Черноморского бассейна», 2014 г.; проект № 213.01-2014/007 «Комплексная эколого-токсикологическая оценка водных ресурсов Азово-Черноморского бассейна», выполняемый в рамках базовой части внутреннего гранта ЮФУ; проект 213.01-07-2014/12ПЧВГ, выполняемый в рамках проектной части внутреннего гранта ЮФУ «Мониторинг и изучение влияния поллютантов, провоцирующих возникновение и передачу бактериальных детерминант резистентности в биотопах Азово-Черноморского бассейна, подверженных антропогенному прессингу»; грант РФФИ №17-04-00787 «Исследование источника генерации активных форм кислорода при бактериальной трансформации углеводородных субстратов и роли АФК в повышении биодоступности углеводов», 2017-2019; Грант Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ "Агроэкологическая оценка и прогноз состояния почв для обеспечения экологической безопасности и повышения продуктивности" № НШ-3464.2018.11, 2018-2019; проект № 6.2379.2017/ПЧ «Исследование действия углеводов на накопление и передачу генов лекарственной устойчивости и оценка углеводород-окисляющего потенциала при загрязнении антибиотиками у почвенных микроорганизмов в модельных микросомах и природных микробиомах», выполняемый в рамках госзадания Министерства образования и науки Российской Федерации (проектная часть), 2017-2019 г.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю, ведущему научному сотруднику лаборатории экологии и молекулярной биологии микроорганизмов Академии биологии и биотехнологии ЮФУ к.б.н. И.С. Сазыкину, заведующей лабораторией, д.б.н. М.А. Сазыкиной, д.с.-х.н., профессору С.И. Колесникову, д.б.н., профессору Т.В. Денисовой за помощь в подготовке и написании работы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР И СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В пяти подглавах представлен обзор отечественной и зарубежной литературы по теме исследования. Дана общая характеристика загрязнения Ростовской области, описаны методы биомониторинга загрязнения окружающей среды, приведен обзор используемых для очистки загрязненных территорий биоремедиационных подходов, рассмотрены специфические (ферментативные) и неспецифические (опосредованные генерацией АФК) механизмы утилизации углеводородных субстратов микроорганизмами.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования. Объектом данного исследования являются почвы, донные отложения импактной зоны Новочеркасской ГРЭС.

2.2. Материалы исследования

Описаны использованные для опытов реактивы, питательные среды и бактериальные штаммы.

2.3. Методы исследования

Отбор проб почвы импактной зоны Новочеркасской ГРЭС проводили в соответствии с ГОСТ 17.4.3.01-83. «Общие требования к отбору проб почвы» в 13 точках отбора в 2013-2015 годах. Координаты точек отбора приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Координаты точек отбора проб почв и донных отложений импактной зоны Новочеркасской ГРЭС

№ точки отбора	Координаты точки отбора	Тип почв (Минкина и др., 2011)
1	47°24'29.43"C 40°14'52.55"В	Чернозем обыкновенный карбонатный среднемощный малогумусный тяжелосуглинистый
2	47°23'2.61"C 40°13'21.15"В	Аллювиально-луговая карбонатная слабогумусированная песчаная почва
3	47°23'0.36"C 40°12'36.69"В	Лугово-черноземная пойменная малогумусная легкоглинистая почва
4	47°23'33.66"C 40°12'51.15"В	Чернозем обыкновенный карбонатный среднемощный малогумусный тяжелосуглинистый
5	47°24'21.28"C 40°13'5.46"В	Чернозем обыкновенный карбонатный среднемощный малогумусный тяжелосуглинистый
6	47°25'4.13"C 40°13'44.27"В	Лугово-черноземная среднемощная малогумусная тяжелосуглинистая почва
7	47°24'43.61"C 40°14'22.54"В	Чернозем обыкновенный карбонатный среднемощный малогумусный тяжелосуглинистый
8	47°24'14.70"C 40° 8'19.87"В	Лугово-черноземная среднемощная малогумусная тяжелосуглинистая почва
8а	47°23'46.98"C 40° 8'19.12"В	Лугово-черноземная среднемощная малогумусная тяжелосуглинистая почва
9	47°25'19.33"C 40° 2'4.21"В	Чернозем обыкновенный карбонатный среднемощный малогумусный тяжелосуглинистый
10	47°25'54.74"C 39°58'40.04"В	Чернозем обыкновенный карбонатный среднемощный малогумусный тяжелосуглинистый
11	47°23'49.05"C 40°14'45.24"В	Чернозем обыкновенный карбонатный среднемощный малогумусный тяжелосуглинистый
12	47°23'26.34"C 40°14'23.68"В	Чернозем обыкновенный карбонатный среднемощный малогумусный тяжелосуглинистый

В качестве условно-чистой почвы использовали образцы, отобранные в ООПТ «Персиановская степь». Отбор проб донных отложений проводили в 2014-2015 годах согласно ГОСТ 17.1.5.01-80. «Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к отбору проб донных отложений водных объектов для анализа на загрязненность» из водных объектов, находящихся в четырех точках отбора в импактной зоне Новочеркасской ГРЭС - ерик Дриганов (в точке 2), река Кадамовка (в точке 6) и река Тузлов в точках 8 и 8а. В качестве экстрагента для приготовления экстрактов почв и донных отложений использовали 1 % раствор Tween-80 в 96 % этаноле.

Образцы почвы и донных отложений для выделения штаммов-деструкторов отбирали в 13 точках в импактной зоне Новочеркасской ГРЭС. Отбор ПАУ-деградирующих бактерий проводили по способности к росту на селективной

питательной среде, содержащей алканы и ароматические углеводороды в качестве единственного источника углерода и энергии.

Идентификацию выделенных штаммов проводили методами молекулярной биологии - с помощью секвенирования гена 16S рибосомальной РНК и изучения масс-спектров рибосомальных белков.

Общую (интегральную) токсичность проб почв и донных отложений определяли методом биотестирования с помощью природного светящегося штамма *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245. При взаимодействии с природными люминесцентными микроорганизмами токсические вещества подавляют клеточный метаболизм и, таким образом, снижают биолюминесценцию бактериальной клетки. В качестве меры интегральной токсичности, оцениваемой по подавлению свечения, использовали индекс токсичности «Т» ($T = 100 (I_k - I_0) / I_k$, где I_k и I_0 , соответственно, интенсивность свечения контрольной суспензии бактериальных клеток, не содержащей токсиканта, и опыта (суспензия с исследуемыми экстрактами почв и донных отложений) при фиксированном времени экспозиции) (Токсикологические методы контроля, 2014). Методика допускает три пороговых уровня индекса токсичности:

- допустимая степень токсичности: индекс токсичности меньше 20;
- образец токсичен: индекс токсичности равен или больше 20 и меньше 50;
- образец сильно токсичен: индекс токсичности равен или более 50.

Измерение уровня биолюминесценции проводили на микропланшетном люминометре LM-01T (Immunotech) в течение 30 минут с интервалом между измерениями в 5 минут, при температуре 25°C.

Определение генотоксичности, прооксидантных и белок-повреждающих свойств экстрактов почв и донных отложений импактной зоны Новочеркасской ГРЭС проводили методом биотестирования с помощью генно-инженерных биолюминесцентных штаммов с индуцируемыми промоторами *E. coli* MG1655 (pRecA-lux), *E. coli* MG1655 (pKatG-lux), *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux), *E. coli* MG1655 (pIbpA-lux). Применение lux-биосенсоров позволяет обнаружить присутствие группы веществ, способных усиливать работу промоторов, под управление которых поставлен lux-оперон.

В качестве меры токсичности, определяемой с помощью индуцируемых lux-биосенсоров, использовали истинный фактор индукции «I» ($I = F_i / K$), где F_i - фактор индукции, K - коэффициент подавления. Фактор индукции (F_i) определяли как отношение интенсивности свечения суспензии клеток lux-биосенсора с индуцируемым промотором в присутствии тестируемого соединения (L_c), к интенсивности свечения контрольной суспензии, не содержащей токсиканта (L_k): $F_i = L_c / L_k$. Коэффициент подавления свечения (K) определяли по формуле: $K = L_c / I_k$, где L_c - интенсивность свечения суспензии lux-штамма с конститутивным промотором в присутствии тестируемого соединения; I_k - интенсивность свечения контрольной суспензии. Измерение уровня биолюминесценции проводили на микропланшетном люминометре LM-01T (Immunotech) в течение двух часов с интервалом между измерениями в 10 минут при температуре 37 °C. Для детекции промутагенов в экстрактах почв и донных отложений использовали метаболическую активацию фракцией S9 микросомных ферментов печени крыс, активированной арохлором («Molttox», США). При достоверном отличии опыта от контроля $I < 2$, обнаруженный токсический эффект оценивали как «слабый», при $2 \leq I \leq 10$ - как «средний», при $I > 10$ - как «сильный».

Определение генерации супероксид-анион радикала штаммами углеводород-деградирующих микроорганизмов проводили методом люцигенин-активированной хемилюминесценции при инкубации микроорганизмов с пентаном, деканом, гексадеканом, циклогексаном, бензолом, нафталином, антраценом («Акватест», Россия), а также коммерческим дизельным топливом «Евро С». В контрольные лунки вместо углеводородов вносили аналогичное количество богатой питательной среды LB. Измерение люминесценции проводили в микропланшетном люминометре Luminoskan Ascent (Thermo Scientific, США) в течение 24 часов с интервалом 30 минут, всего 48 измерений. Опыты проводили в 8 повторностях. Уровень интенсивности люминесценции считали пропорциональным уровню генерации супероксид-анион радикала.

Определение продукции и накопления пероксида водорода штаммами углеводород-деградирующих микроорганизмов осуществляли методом люминол-активированной хемилюминесценции при инкубации микроорганизмов с теми же углеводородами в течение 30 дней (в контрольную колбу вместо углеводородов вносили аналогичное количество глюкозы). Измерение хемилюминесценции проводили в 8 повторностях на микропланшетном люминометре Luminoscan Ascent, свечение каждой лунки измеряли в течение 100 секунд с интервалом в 1 секунду. В начале измерения в каждую лунку вносили 20 мкл раствора пероксидазы хрена (0,01ед/мл) с помощью встроенного в прибор диспенсера. Уровень хемилюминесценции считали пропорциональным уровню накопления перекиси.

Статистическую обработку результатов исследования проводили стандартными методами математической статистики. Величины доверительных интервалов рассчитывали для $p < 0,05$. Для оценки статистической значимости различий использовали t-критерий Стьюдента (Владимирский, 1983; Лакин, 1990). Для оценки корреляционных зависимостей между результатами биотестирования и данными химического анализа ПАУ вычисляли коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r). Все расчеты производили с помощью статистического пакета Microsoft Office Excel.

Работу с микроорганизмами проводили в соответствии с СП 1.3.2322-08 (СП 1.3.2322-08., 2008) и ГОСТ Р 51446-99 (ГОСТ Р 51446-99, 1999).

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Определение интегральной токсичности проб почв и донных отложений импактной зоны Новочеркасской ГРЭС с помощью природного люминесцентного штамма *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245

Интегральная токсичность проб почв импактной зоны Новочеркасской ГРЭС

Общую токсичность проб почв определяли по подавлению биолюминесценции природного светящегося штамма *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245 в присутствии экстрактов почв. Было показано, что в 2013 году из 13 отобранных проб сильно токсичными являлись 3 пробы, отобранные в точках 2, 5 и 12; токсичными - 6 проб из точек 1, 3, 4, 6, 7, 11. Образцы из точек 8-10 обладали допустимой степенью токсичности (табл.2).

Таблица 2 - Индекс токсичности почв импактной зоны Новочеркасской ГРЭС, определенный с помощью природного люминесцентного штамма *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245

Год	Номер точки отбора проб почв												
	1	2	3	4	5	6	7	8	8а	9	10	11	12
2013	20,45 ±1,05*	66,39 ±3,17*	49,6 ±2,90*	37,35 ±1,09*	68,77 ±3,28*	29,72 ±1,27*	22,82 ±1,25*	19,55 ±0,90*	10,27 ±0,43*	19,60 ±0,88*	15,25 ±0,83*	48,75 ±2,00*	53,89 ±2,12*
2014	3,35 ±0,12	5,83 ±0,13*	7,28 ±0,22*	6,71 ±0,22*	9,09 ±0,25*	15,08 ±0,84*	10,64 ±0,45*	19,83 ±0,58*	3,36 ±0,11	60,98 ±3,16*	38,73 ±1,18*	46,81 ±2,09*	45,23 ±1,10*
2015	66,55 ±3,37*	67,96 ±3,48*	55,51 ±2,17*	64,89 ±3,32*	68,35 ±3,19*	57,5 2,16*	60,53 ±3,06*	63,22 ±3,18*	54,1 ±2,25*	48,95 ±2,11*	35,6 ±1,19*	65,57 ±2,4*	63,75 ±2,18*

* отличия от контроля статистически значимы, t-критерий; $p < 0,05$

В 2014 году сильная токсичность была показана только в почве, отобранной в точке № 9. Образцы почв из точек 10-12 были определены как токсичные, а для остальных проб, отобранных в точках 1-8а, была зарегистрирована допустимая степень токсичности. В 2015 году в большинстве проб почв была зарегистрирована сильная степень токсичности, в пробах почв из точек 9 и 10 выявлен средний уровень токсичности. В пробе фоновой почвы был зарегистрирован допустимый уровень токсичности (индекс токсичности составил 2,10).

По результатам трехлетнего изучения уровня интегральной токсичности почв импактной зоны Новочеркасской ГРЭС были выявлены точки со стабильно высоким уровнем токсичности - № 11 и 12, находящиеся в непосредственной близости от ГРЭС. В точках 2-5, находящихся с наветренной стороны от Новочеркасской ГРЭС, в 2013 и 2015 годах наблюдался значительный уровень токсичности, тогда как в 2014 г. было зарегистрировано ее снижение. Возможно, такие колебания связаны с изменением количества выбросов в атмосферу Новочеркасской ГРЭС. Так, согласно данным Министерства природных ресурсов и экологии Ростовской области (Экологический вестник, 2014), уменьшение выбросов загрязняющих веществ в атмосферный воздух в 2014 году в сравнении с 2013 годом филиалом ООО «ОГК-2» – НчГРЭС объясняется изменением топливного баланса станции (сжигалось большее количество газа). В почвах из точек 1, 6, 7, которые находятся северо-восточнее ГРЭС, в 2013 году был зафиксирован средний уровень токсичности (индексы токсичности, соответственно, 20,45; 29,72 и 22,82), а в 2014 г. токсичность не была зарегистрирована. При этом в 2015 году отмечено повышение токсичности проб почв из этих точек, индекс токсичности Т которых был выше 50, что интерпретировалось как сильная степень токсичности образцов. По-видимому, такая динамика также связана с функционированием Новочеркасской ГРЭС.

Интегральная токсичность проб донных отложений импактной зоны Новочеркасской ГРЭС

Анализ проб донных отложений, отобранных в 2014 и 2015 годах, показал, что все образцы являются сильно токсичными (табл.3). Это обусловлено общей неблагоприятной экологической ситуацией на значительной акватории водотоков города Новочеркаска и его окрестностей, сбросом недостаточно очищенных сточных вод промышленных предприятий в водоемы города (Экологический вестник, 2014).

Таблица 3 - Индекс токсичности донных отложений импактной зоны Новочеркасской ГРЭС, определенный с помощью природного люминесцентного штамма *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245

Год	Номер точки отбора проб донных отложений			
	2	6	8	8а
2014	97,12±5,35*	96,62±5,12*	40,54±2,10*	92,01±5,16*
2015	92,43±5,45*	85,66±4,87*	95,12±5,02*	87,45±4,29*

* отличия от контроля статистически значимы, t-критерий; $p < 0,05$

3.2 Определение генотоксичности, прооксидантных и белок-повреждающих свойств экстрактов почв и донных отложений импактной зоны Новочеркасской ГРЭС.

Исследование генотоксичности почв окрестностей Новочеркасской ГРЭС с помощью люминесцентного штамма *E. coli* MG1655 (pRecA-lux) показало отсутствие прямых мутагенов в большинстве проб.

Однако при изучении генотоксичности почв при помощи штамма *E. coli* MG1655 (pRecA-lux) с метаболической активацией в половине проб (точки 1-3, 5, 7) были обнаружены вещества промутагенной природы (табл. 4), которые при попадании в организм и их метаболизме ферментами печени приобретают мутагенные свойства. В условно-чистой почве из ООПТ «Персиановская степь» не было обнаружено веществ мутагенной и промутагенной природы (фактор индукции составил 0,96 и 1,00, соответственно).

Таблица 4 - Биолюминесцентный ответ (I) штамма *E. coli* MG1655 (pRecA-lux) на воздействие экстрактов почв импактной зоны Новочеркасской ГРЭС при использовании метаболической активации

Год	Номер точки отбора проб почвы												
	1	2	3	4	5	6	7	8	8а	9	10	11	12
2013	1,78± 0,02*	1,29± 0,01	1,50± 0,02*	1,41± 0,04	1,50± 0,04*	1,18± 0,01	1,54± 0,03*	1,30± 0,01	1,00± 0,01	1,27± 0,02	1,19± 0,02	1,27± 0,03	1,18± 0,02
2014	1,50± 0,01*	1,50± 0,02*	1,51± 0,01*	1,42± 0,02	1,34± 0,01	1,41± 0,01	1,50± 0,02*	1,22± 0,01	1,31± 0,02	1,24± 0,01	1,40± 0,02	1,14± 0,01	1,24± 0,02
2015	1,18± 0,01	1,42± 0,03	0,94± 0,01	1,17± 0,01	1,28± 0,02	1,15± 0,01	1,29± 0,03	1,27± 0,02	1,40± 0,01	1,13± 0,01	1,18± 0,01	1,32± 0,02	1,08± 0,01

* отличия от контроля статистически значимы, t-критерий; $p < 0,05$

Изучение прооксидантных свойств почв окрестностей Новочеркасской ГРЭС, обусловленных наличием пероксидов, с помощью штамма *E. coli* MG1655 (pKatG-lux), показало низкий процент положительных проб. Они были отобраны в двух точках (8 и 11) в 2015 году. Фактор индукции составил, соответственно, 3,14 и 3,55 (табл. 5).

В фоновой почве, отобранной в заповеднике «Персиановская степь», показано отсутствие пероксидов (фактор индукции - 0,95).

Гораздо больше проб почв проявляли прооксидантную активность, обусловленную наличием веществ, провоцирующих генерацию супероксид-анион радикала (табл. 6). Достоверный ответ биосенсора *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux) был обнаружен в пробах 1-6, отобранных в 2013 году, в последующие годы в этих пробах не было зарегистрировано значимого люминесцентного ответа. В пробах 8, 11 и 12, напротив, присутствие супероксид-анион радикала было выявлено в 2015 году (фактор индукции, соответственно, 2,56; 1,82 и 1,85). В фоновых пробах

почвы показано отсутствие веществ - генераторов супероксид-анион радикала (фактор индукции 0,99).

Таблица 5 - Билюминесцентный ответ (I) штамма *E. coli* MG1655 (pKatG-lux) на воздействие экстрактов почв импактной зоны Новочеркасской ГРЭС

Год	Номер точки отбора проб почвы												
	1	2	3	4	5	6	7	8	8a	9	10	11	12
2013	0,91± 0,01	0,64± 0,01	0,92±0 ,01	0,70± 0,01	0,71± 0,01	0,82± 0,01	0,81± 0,01	0,85± 0,01	0,60± 0,01	0,80± 0,01	0,93± 0,01	0,56± 0,01	0,58± 0,01
2014	0,96± 0,02	1,05± 0,02	0,93±0 ,01	0,91± 0,01	0,95± 0,01	1,02± 0,01	1,05± 0,01	0,94± 0,01	0,96± 0,01	1,02± 0,01	1,15± 0,02	1,06± 0,01	0,99± 0,01
2015	1,28± 0,02	1,3± 0,02	1,32±0 ,02	1,36± 0,01	1,33± 0,01	1,35± 0,01	1,34± 0,01	3,14± 0,06*	1,34± 0,01	1,30± 0,01	1,18 ± 0,01	3,55± 0,05*	1,06± 0,01

* отличия от контроля статистически значимы, t-критерий; p<0,05

Таблица 6 - Билюминесцентный ответ (I) штамма *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux) на воздействие экстрактов почв импактной зоны Новочеркасской ГРЭС

Год	Номер точки отбора проб почвы												
	1	2	3	4	5	6	7	8	8a	9	10	11	12
2013	1,89± 0,03*	1,50± 0,02*	1,54± 0,02*	1,53± 0,01*	1,74± 0,02*	1,90± 0,03*	1,42± 0,02	1,39± 0,02	1,4± 0,02	1,45± 0,02	1,30± 0,01	1,22± 0,01	0,92± 0,01
2014	1,08± 0,01	1,03± 0,01	0,97± 0,01	1,03± 0,01	1,00±0 ,01	1,04± 0,01	1,00± 0,01	1,01± 0,01	1,05± 0,01	1,04± 0,01	1,03± 0,01	1,01± 0,01	1,07±0 ,01
2015	1,02± 0,01	1,15± 0,01	1,06± 0,01	1,00± 0,01	1,26±0 ,02	1,05± 0,01	1,08± 0,01	2,56± 0,04*	1,12± 0,01	1,20± 0,02	1,40± 0,02	1,82± 0,03*	1,85± 0,03*

* отличия от контроля статистически значимы, t-критерий; p<0,05

Анализ проб почв с помощью бактериального lux-биосенсора *E. coli* MG1655 (pIbrA-lux) показал, что практически все образцы содержат вещества, повреждающие клеточные белки. К ним могут быть отнесены фенол или формальдегид, содержание которых в исследуемом районе превышает средний уровень по России (Экологический вестник, 2013). Наиболее значительный ответ биосенсора был зарегистрирован в 2013 году, с последующим снижением факторов индукции в 2014 и 2015 годах (табл. 7). При этом в пробах условно-чистой почвы не было выявлено веществ, повреждающих белки (фактор индукции - 1,32).

Таблица 7 - Билюминесцентный ответ (I) штамма *E. coli* MG1655 (pIbrA-lux) на воздействие экстрактов почв импактной зоны Новочеркасской ГРЭС

Год	Номер точки отбора проб почвы												
	1	2	3	4	5	6	7	8	8a	9	10	11	12
2013	5,52± 0,06*	4,25± 0,06*	4,62± 0,01*	4,97± 0,04*	5,88± 0,07*	6,54± 0,08*	5,39± 0,07*	3,48± 0,06*	4,63± 0,06*	1,40± 0,01	1,48± 0,03	5,70± 0,07*	4,40± 0,05*
2014	1,69± 0,02*	1,45± 0,02	1,73± 0,03*	1,52± 0,02*	1,37± 0,02	1,57± 0,01*	1,50± 0,03*	1,53± 0,02*	1,27± 0,01	1,16± 0,01	1,58± 0,02*	1,53± 0,02*	1,26± 0,01
2015	1,50± 0,02*	1,33± 0,01	1,43± 0,01	1,21± 0,01	1,34± 0,01	1,19± 0,01	1,12± 0,01	1,35± 0,01	1,34± 0,01	1,12± 0,01	1,25± 0,01	1,43± 0,02	1,37± 0,02

* отличия от контроля статистически значимы, t-критерий; p<0,05

Изучение проб донных отложений, отобранных в 2014 году, показало, что в пробах из точек 2, 8 и 8a зарегистрирован слабый генотоксический эффект, обусловленный присутствием непрямых мутагенов (табл. 8). В точках 2, 6 и 8 обнаружено незначительное присутствие веществ, повреждающих клеточные

белки. Веществ, вызывающих окислительный стресс (генераторов пероксида водорода и супероксид-анион радикала), выявлено не было.

Таблица 8 - Фактор индукции биолюминесцентных штаммов *E. coli* MG1655 (pRecA-lux), *E. coli* MG1655 (pKatG-lux), *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux), *E. coli* MG1655 (pIbpA-lux) в присутствии экстрактов донных отложений, отобранных в 2014 году в импактной зоне НЧГРЭС

№ точки отбора	<i>E. coli</i> MG1655 (pRecA-lux)		<i>E. coli</i> MG1655 (pKatG-lux)	<i>E. coli</i> MG1655 (pSoxS-lux)	<i>E. coli</i> MG1655 (pIbpA-lux)
	+S9	-S9			
2	1,50±0,02*	1,12±0,01	0,99±0,01	1,03±0,01	1,59±0,02*
6	1,18±0,01	1,17±0,01	1,03±0,01	0,91±0,01	1,6±0,02*
8	1,53±0,01*	1,07±0,01	1,04±0,01	1,19±0,01	1,5±0,02*
8a	1,69±0,02*	1,06±0,01	1,00±0,01	0,98±0,01	1,32±0,01

* отличия от контроля статистически значимы, t-критерий; $p < 0,05$

В 2015 году, напротив, генотоксичность образцов донных отложений снизилась, но значительно возросли их прооксидантные свойства (табл. 9). С помощью биолюминесцентного сенсора *E. coli* MG1655 (pKatG-lux), реагирующего на присутствие пероксида водорода в среде, показано, что все пробы донных отложений характеризовались средним уровнем прооксидантной активности.

Таблица 9 - Фактор индукции биолюминесцентных штаммов *E. coli* MG1655 (pRecA-lux), *E. coli* MG1655 (pKatG-lux), *E. coli* MG1655 (pSoxS-lux), *E. coli* MG1655 (pIbpA-lux) в присутствии экстрактов донных отложений, отобранных в 2015 году

№ точки отбора	<i>E. coli</i> MG1655 (pRecA-lux)		<i>E. coli</i> MG1655 (pKatG-lux)	<i>E. coli</i> MG1655 (pSoxS-lux)	<i>E. coli</i> MG1655 (pIbpA-lux)
	+S9	-S9			
2	1,27±0,01	1,33±0,01	2,06±0,03*	0,98±0,01	0,97±0,01
6	1,22±0,01	1,16±0,01	2,57±0,03*	1,05±0,01	0,95±0,01
8	1,17±0,01	1,45±0,02	2,13±0,02*	1,05±0,01	0,95±0,01

* отличия от контроля статистически значимы, t-критерий; $p < 0,05$

3.3. Корреляционный анализ токсичности проб почв и донных отложений, определенной с помощью бактериальных lux-биосенсоров, и содержания ПАУ

Был проведен корреляционный анализ результатов, полученных при исследовании проб почв и донных отложений методом биотестирования с использованием батареи бактериальных lux-биосенсоров, и данных химического анализа (Сушкова, 2017). По данным проведенных ранее исследований, для импактной зоны Новочеркасской ГРЭС характерно загрязнение полиароматическими углеводородами с превышением ПДК в ряде точек от 2 до 22 раз (Сушкова, 2017). Учитывая вышесказанное, была проанализирована связь между содержанием этих поллютантов и результатами биотестирования. Была показана значимая корреляция между интегральной токсичностью, определенной с помощью штамма *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245, и содержанием в почвах нафталина (коэффициент ранговой корреляции Спирмена $r=0,657$) (табл. 10). Не было обнаружено связи между содержанием в почвах бенз(а)пирена (и суммарных ПАУ) и ответом биосенсорных штаммов.

Таблица 10 – Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена между результатами биотестирования почв, содержанием токсикантов и расстоянием до Новочеркасской ГРЭС (только значимые результаты, $p < 0,05$)

Биосенсор Токсикант/расстояние	Индекс токсичности (Т) <i>Vibrio aquamarinus</i> ВКПМ В-11245	Фактор индукции (I) <i>E. coli</i> MG1655 (pIbpA-lux)
Нафталин	0,657	
Расстояние до ГРЭС	-0,633	-0,722

Была проанализирована связь между расстоянием от Новочеркасской ГРЭС до точек отбора проб и ответом бактериальных lux-биосенсоров. Показана отрицательная зависимость между расстоянием и интегральной токсичностью, определенной с помощью *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245 ($r = -0,633$), а также между расстоянием и фактором индукции штамма *E. coli* MG1655 (pIbpA-lux) ($r = -0,722$), реагирующего на вещества, повреждающие белки. Таким образом, можно сделать вывод о влиянии деятельности Новочеркасской ГРЭС на состояние почв импактной зоны, при этом основным источником токсикантов служили преимущественно вещества, вызывающие повреждение белков.

Иные зависимости обнаружены при анализе токсичности донных отложений. Так, показана значительная корреляция люминесцентных ответов штаммов *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245, *E. coli* MG1655 (pRecA-lux), *E. coli* MG1655 (pKatG-lux) и *E. coli* MG1655 (pIbpA-lux) с содержанием бенз(а)пирена (коэффициенты ранговой корреляции Спирмена $r = 0,600$; $r = 1,000$; $r = 0,500$ и $r = 1,000$, соответственно). Кроме того, показана корреляция между ответом штамма *E. coli* MG1655 (pKatG-lux), реагирующего на присутствие пероксидов в среде, и суммарным содержанием ПАУ ($r = 0,800$) (табл. 11). Таким образом, токсичность донных отложений обусловлена в большей степени присутствием в них бенз(а)пирена, который обладает генотоксическими свойствами. Кроме того, прооксидантные свойства донных отложений обусловлены суммарным содержанием ПАУ.

Таблица 11 – Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена между результатами биотестирования донных отложений и содержанием токсикантов (только значимые результаты, $p < 0,05$)

Биосенсор Токсикант /расстояние	Индекс токсичности (Т) <i>Vibrio aquamarinus</i> ВКПМ В-11245	Фактор индукции (I) <i>E. coli</i> MG1655 (pRecA-lux)	Фактор индукции (I) <i>E. coli</i> MG1655 (pKatG-lux)	Фактор индукции (I) <i>E. coli</i> MG1655 (pIbpA-lux)
Бенз(а)пирен	0,600	1,000	0,500	1,000
Сумма ПАУ			0,800	
Расстояние до ГРЭС	-0,5			

3.4 Идентификация культивируемых ПАУ-деградирующих микроорганизмов, выделенных из почв и донных отложений импактной зоны Новочеркасской ГРЭС

В исследованных почвах импактной зоны Новочеркасской ГРЭС показано невысокое разнообразие культивируемых форм с преобладанием 1-2 видов микроорганизмов (табл. 12). Результаты идентификации выделенных микроорганизмов по гену 16S рибосомальной РНК и масс-спектрометрическому анализу бактериальных белков показали, что доминирующим видом ПАУ-

деградирующих микроорганизмов являлся *Rhodococcus erythropolis*, обнаруженный в 59 % проб (10 проб из 17). Это достаточно распространенные в окружающей среде нокардиоформные бактерии, обладающие широким спектром ферментных систем и, в связи с этим, чрезвычайной биохимической пластичностью. Их способность эмульгировать и утилизировать углеводороды в значительной степени обусловлена особенностями строения их клеточной оболочки, которая имеет липофильный характер, т.е. высокое сродство к гидрофобным субстратам. В связи с этим *Rhodococcus erythropolis* в настоящее время является активно изучаемым и очень перспективным микроорганизмом для использования в целях биоремедиации загрязненных территорий.

Таблица 12 - Результаты идентификации культивируемых углеводород-деградирующих микроорганизмов, выделенных из почв и донных отложений импактной зоны Новочеркасской ГРЭС.

№ точки	Название штамма микроорганизма
1	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
2	<i>Arthrobacter aurescens</i>
2 (донные отложения)	<i>Pseudomonas koreensis</i>
3	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
4	<i>Isoptericola sp.</i>
5	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
6	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
	<i>Oerskovia turbata</i>
6 (донные отложения)	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>
7	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
8	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
8 (донные отложения)	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
8а	<i>Arthrobacter polychromogenes</i>
	<i>Arthrobacter sulfonivorans</i>
8а (донные отложения)	<i>Pseudomonas putida</i>
9	<i>Oerskovia turbata</i>
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
10	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
11	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
12	<i>Rhodococcus erythropolis</i>

В пробах почвы, отобранных в точках № 6 и № 9, кроме *Rhodococcus erythropolis*, были выделены актинобактерии *Oerskovia turbata*. В остальных пробах почв преобладающими видами являлись *Arthrobacter aurescens*, *Arthrobacter polychromogenes*, *Arthrobacter sulfonivorans*, *Isoptericola sp.*, которые являются типичными обитателями загрязненных почв.

В ряде работ получены сходные данные, подтверждающие, что бактерии рода *Arthrobacter* способны к деструкции нафталина и фенантрена.

В пробах донных отложений доминирующими микроорганизмами являлись различные виды рода *Pseudomonas*. Так, бактерии из точки отбора № 2 были идентифицированы как *Pseudomonas koreensis*, из точки отбора № 6 - как *Pseudomonas brassicacearum* и *Pseudomonas chlororaphis*, в точке № 8 обнаружены *Pseudomonas stutzeri*, а в точке № 8а - *Pseudomonas putida*.

Использование классических методов оценки микробного разнообразия, основанных на выделении культивируемых углеводород-окисляющих бактерий, имеет большое прикладное значение, и позволяет выбрать определенные штаммы для использования их в целях биоремедиации загрязненных территорий. Штаммы, выделенные из конкретных загрязненных местообитаний, имеют меньше шансов быть элиминированными из-за конкурентных взаимоотношений с автохтонной микрофлорой и их применение наносит меньший ущерб сложившемуся аборигенному почвенному микробиому. Таким образом, выделенные нами из почв Новочеркасской ГРЭС штаммы-деструкторы могут быть в дальнейшем использованы для очистки загрязненных углеводородами территорий.

3.5. Генерация супероксид-анион радикала штаммами углеводород-деградирующих микроорганизмов при инкубации с различными углеводородами в качестве единственного источника углерода и энергии

Генерация супероксид-анион радикала была изучена у углеводород-деградирующих бактерий, выделенных из почв и донных отложений импактной зоны НчГРЭС, а также у 14 штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов из коллекции лаборатории экологии и молекулярной биологии микроорганизмов АБиБ ЮФУ. Достоверный люминесцентный ответ в присутствии различных углеводородов в качестве единственного источника углерода и энергии был зарегистрирован у трех штаммов *Rhodococcus erythropolis*, выделенных в импактной зоне НчГРЭС из почвы в точках 1, 8 и 11; штамма *Isoptericola sp.* из точки 4; а также у штаммов *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida*, выделенных из донных отложений в точках 2, 6, 8 и 8а, соответственно.

Из коллекционных штаммов достоверное усиление хемилюминесценции в ответ на присутствие различных углеводородов показан у штаммов *Achromobacter xylosoxidans* № 4, *Achromobacter xylosoxidans* № 5, *Achromobacter xylosoxidans* № 7, *Acinetobacter calcoaceticus* № 6, *Acinetobacter calcoaceticus* № 13.

У штамма *Rhodococcus erythropolis*, выделенного из почвы в точке 1 импактной зоны НчГРЭС, наиболее интенсивную генерацию супероксид-анион радикала наблюдали при инкубации с пентаном (в 8 раз выше контроля), гексадеканом (в 7 раз выше контроля), циклогексаном (в 4,2 раза выше контроля), нафталином (в 4,3 раза выше контроля), антраценом (в 4,2 раза выше контроля) и дизельным топливом (в 3,8 раза выше контроля) (рис. 1).

Штамм *Isoptericola sp.* генерировал супероксид-анион радикал в ответ на присутствие в среде пентана (в 10 раз выше по сравнению с контролем), декана (в 5,6 раз выше контроля), гексадекана (в 10,2 раза выше контроля), циклогексана (в 10,7 раз выше контроля) и дизельного топлива (в 13 раз выше контроля). Штамм *Rhodococcus erythropolis*, выделенный из почвы в точке 8 импактной зоны НчГРЭС, показал достоверное увеличение уровня хемилюминесценции по сравнению с контролем в присутствии пентана (в 3,9 раз), гексадекана (в 2,8 раза), бензола (в 3 раза), нафталина (в 2,6 раза) и антрацена (в 3 раза). Штамм *Rhodococcus erythropolis*, выделенный из почвы в точке 11 НчГРЭС, генерировал супероксид-анион радикал при инкубации с пентаном (уровень хемилюминесценции отличался от контрольного в 6,3 раза), деканом (в 5,9 раза), циклогексаном (в 8,7 раз), бензолом (в 6,7 раз) и дизельным топливом (в 5,4 раза).

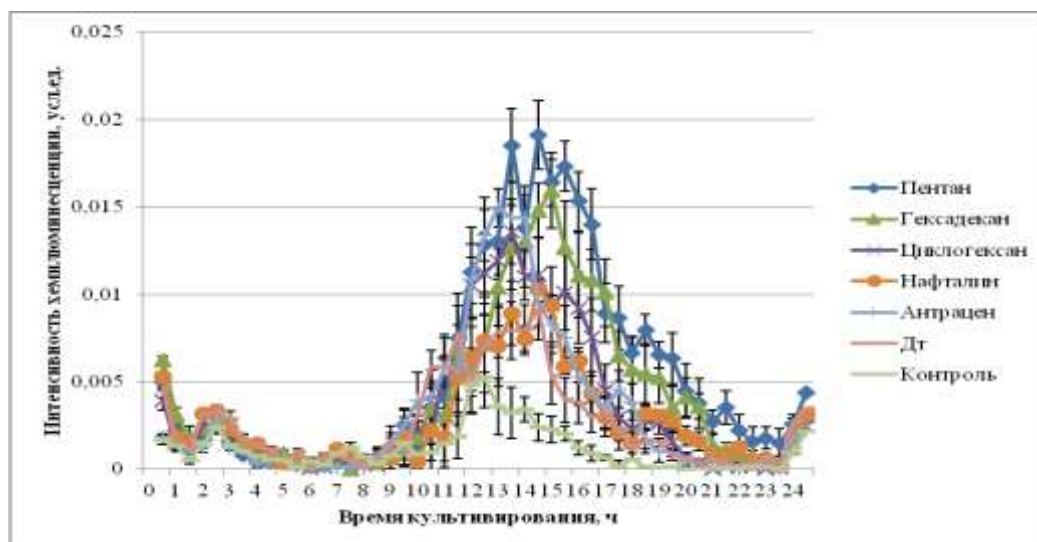


Рисунок 1 - Интенсивность генерации супероксид-анион радикала штаммом *Rhodococcus erythropolis*, выделенным из почвы в точке 1 импактной зоны НчГРЭС при инкубации с различными углеводородами в качестве единственного источника углерода и энергии.

У штамма *Pseudomonas koreensis*, выделенного из донных отложений, наиболее высокий уровень генерации супероксид-анион радикала наблюдали при инкубации с деканом (в 87 раз выше контроля). Кроме того, ответ был получен в присутствии гексадекана (в 6,7 раз больше контроля), бензола (в 5,2 раза) и нафталина (в 8,9 раз). Менее интенсивную генерацию супероксид-анион радикала наблюдали у штамма *Pseudomonas chlororaphis* в присутствии в среде пентана (индукция в 3,1 раза), декана (в 2,8 раза) и дизельного топлива (в 4,6 раза). У *Pseudomonas stutzeri* увеличение уровня хемилюминесценции, по сравнению с контрольным, показано при инкубации с деканом (в 2,9 раза), гексадеканом (в 5 раз), циклогексаном (в 9,3 раза) и нафталином (в 3,5 раза). Менее интенсивный ответ получен для штамма *Pseudomonas putida*, у которого генерация супероксид-анион радикала отмечалась в присутствии декана (в 2,2 раза выше контроля), циклогексана (в 2,4 раза) и нафталина (в 2,4 раза).

Штамм *Achromobacter xylosoxidans* № 4 наиболее интенсивно генерировал супероксид-анион радикал при инкубации с циклогексаном (в 6,8 раза больше по сравнению с контролем), деканом (в 2,4 раза больше контроля) и дизельным топливом (в 2,8 раза). У штамма *Achromobacter xylosoxidans* № 5 наиболее высокий уровень генерации супероксид-анион радикала показан при инкубации с циклогексаном, с максимальной индукцией в 3,4 раза относительно контроля, и пентаном (индукция в 1,6 раза). Было показано, что *Achromobacter xylosoxidans* № 7, так же, как и другие штаммы *Achromobacter xylosoxidans* - № 4 и 5, усиливает генерацию супероксид-анион радикала в 3,3 раза при инкубации с циклогексаном в качестве единственного источника углерода и энергии.

У штамма *Acinetobacter calcoaceticus* № 6 при инкубации с алифатическими и ароматическими углеводородами, в отличие от штаммов *Achromobacter xylosoxidans*, максимальная продукция супероксид-анион радикала была обнаружена в присутствии в среде дизельного топлива (в 2,7 раза относительно контроля), циклогексана (в 1,75 раза), и пентана (в 1,5 раза). Уровень генерации

супероксид-анион радикала при инкубации с нафталином был в 5,4 раза выше контроля.

При изучении генерации супероксид-анион радикала штаммом *Acinetobacter calcoaceticus* №13 было показано, что наиболее высокий уровень хемилюминесценции индуцируется в присутствии дизельного топлива - в 13,9 раз больше, чем в контрольных образцах. Кроме того, отмечено увеличение интенсивности хемилюминесценции в ответ на присутствие нафталина (индукция в 8 раз относительно контрольных образцов), смеси бензола и антрацена (в 4,7 раза), антрацена (в 3,6 раза) и циклогексана (в 1,95 раза) (рис. 2).

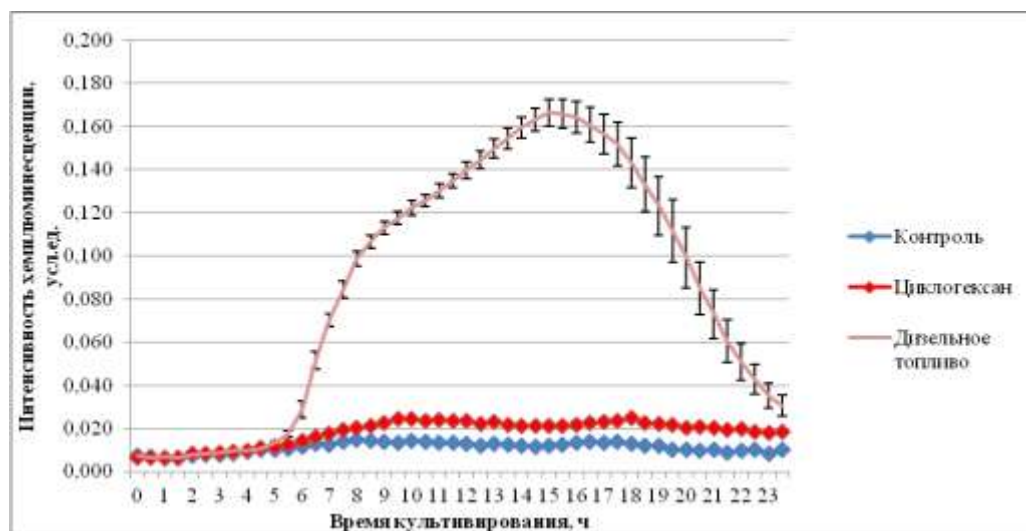


Рисунок 2 - Интенсивность генерации супероксид-анион радикала штаммом *Acinetobacter calcoaceticus* № 13 при инкубации с алифатическими углеводородами в качестве единственного источника углерода и энергии.

3.6. Генерация пероксида водорода штаммами углеводород-деградирующих микроорганизмов при инкубации с различными углеводородами в качестве единственного источника углерода и энергии

Также была исследована способность штаммов ПАУ-деградирующих микроорганизмов продуцировать пероксид водорода в ответ на присутствие в среде углеводородов.

У всех изученных штаммов генерация пероксида в разной степени усиливалась при инкубации с дизельным топливом в качестве единственного источника углерода и энергии. Так, было зарегистрировано усиление хемилюминесценции от 3-кратного у штамма *Rhodococcus erythropolis*, выделенного из почвы в точке 1 импактной зоны НчГРЭС до 9,4-кратного у штамма *Pseudomonas putida* из донных отложений в точке 8а НчГРЭС (рис. 3.).

У коллекционных нефтеокисляющих микроорганизмов наблюдали увеличение уровня хемилюминесценции при инкубации с дизельным топливом от 5,2-кратного у штамма *Acinetobacter calcoaceticus* № 13 до 178-кратного у штамма *Achromobacter xylosoxidans* № 5 (рис. 4).

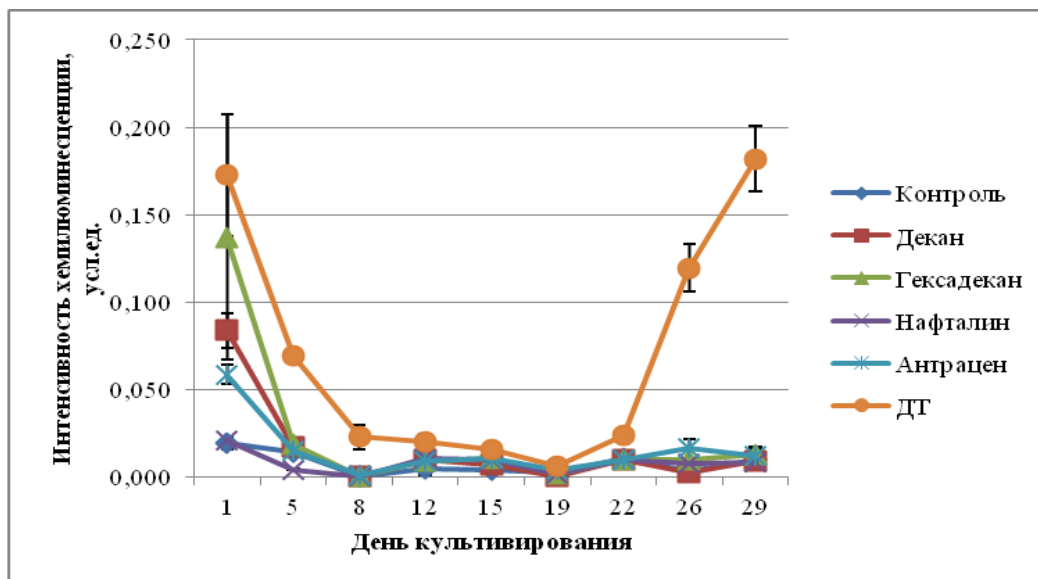


Рисунок 3 - Накопление пероксида водорода штаммом *Pseudomonas putida*, выделенным из донных отложений точки 8а НчГРЭС при инкубации с различными углеводородами в качестве единственного источника углерода и энергии.

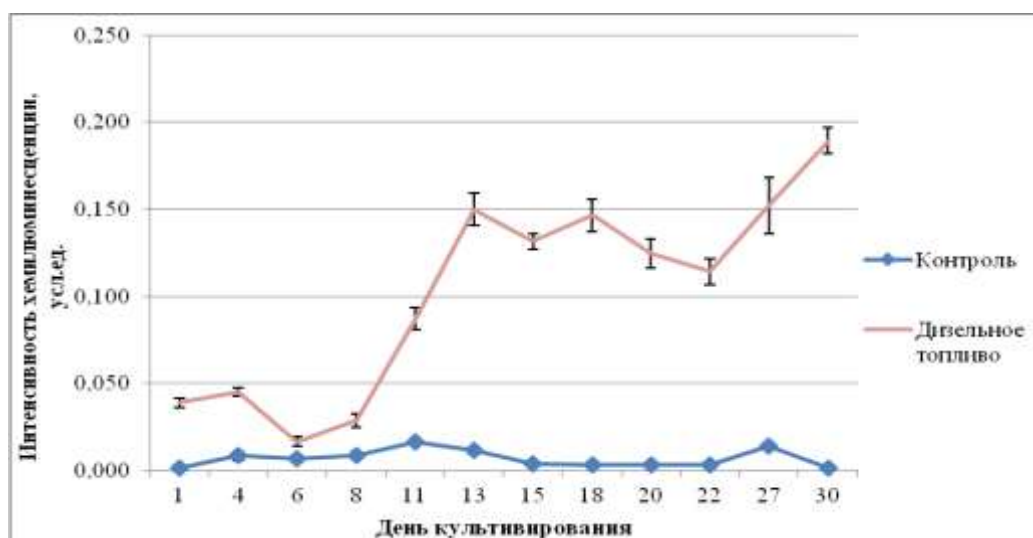


Рисунок 4 - Накопление пероксида водорода штаммом *Achromobacter xylosoxidans* № 5 при инкубации с различными углеводородами в качестве единственного источника углерода и энергии.

Таким образом, в ходе изучения процесса утилизации различных углеводов ПАУ-деградирующими микроорганизмами нами было доказано образование активных форм кислорода, таких как супероксид-анион радикал и пероксид водорода. При этом достоверно отличающийся от контроля уровень генерации супероксида наблюдался у ряда исследованных микроорганизмов, в то время как накопление пероксидов обнаружено у всех штаммов. Наряду с разрушительным действием на клетку супероксид-анион радикала и пероксида водорода, эти АФК могут играть важную роль в повышении биодоступности труднодеградируемых соединений, неспецифически окисляя их.

ВЫВОДЫ

1) Изучение проб почв и донных отложений импактной зоны Новочеркасской ГРЭС показало, что 66,7 % исследованных образцов почв и 100 % образцов донных отложений обладают интегральной токсичностью. 20,5 % проб почв и 42,8 % проб донных отложений содержат генотоксические вещества промутагенной природы. 5 % проб почв и 42,8 % донных отложений обладают прооксидантными свойствами, обусловленными присутствием пероксидов. В 29 % образцов почв источником прооксидантных свойств являлись вещества-генераторы супероксид-анион радикала. Вещества, повреждающие белки, обнаружены в 51,3 % проб почвы и 42,8 % проб донных отложений.

2) При исследовании проб фоновой (условно-чистой) почвы, отобранной в ООПТ «Персиановская степь», с помощью батареи бактериальных lux-биосенсоров, был зарегистрирован допустимый уровень интегральной токсичности, показано отсутствие генотоксических, прооксидантных, повреждающих белки веществ. Это свидетельствует о релевантности биосенсорного анализа и пригодности его для целей биотестирования в рамках мониторинга состояния окружающей среды.

3) Наибольшее количество проб почв, обладающих интегральной токсичностью (100%), выявлено в 2015 году. Наибольшее количество положительных эффектов, от общего количества проб почв, выявлено в точках 1 (4 %), 3 (3,6 %), 11 (3,6 %), 7 (3 %). В пробах донных отложений интегральная токсичность регистрировалась в оба года исследований (2014 и 2015).

4) Сравнительный анализ результатов химического анализа и данных биотестирования почв показал наличие положительной корреляции между содержанием нафталина и величиной индекса токсичности, определенного с помощью *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245 ($r=0,657$). Также выявлена корреляционная зависимость ($r=0,490$) между содержанием нафталина и фактором индукции биосенсора *E. coli* MG1655 (pIbpA-lux), реагирующего на вещества, повреждающие белки.

5) Установлена отрицательная корреляция между расстоянием от точек отбора проб почв до Новочеркасской ГРЭС и интегральной токсичностью ($r=-0,65$). Отрицательный коэффициент корреляции также зарегистрирован между расстоянием и фактором индукции биосенсора *E. coli* MG1655 (pIbpA-lux) ($r=-0,72$). Это свидетельствует о том, что НчГРЭС является значимым источником загрязнения исследуемой территории, причем основным токсическим эффектом является повреждение белков клетки.

6) В донных отложениях показана значимая корреляция между ответами штаммов *Vibrio aquamarinus* ВКПМ В-11245, *E. coli* MG1655 (pRecA-lux), *E. coli* MG1655 (pKatG-lux) и *E. coli* MG1655 (pIbpA-lux) с содержанием бенз(а)пирена ($r=0,600$; $r=1,000$; $r=0,500$ и $r=1,000$, соответственно). Также найдена корреляция между фактором индукции штамма *E. coli* MG1655 (pKatG-lux), реагирующего на присутствие пероксидов в среде, и суммарным содержанием ПАУ ($r=0,800$). Таким образом, основным источником интегральной токсичности, генотоксических и белок-повреждающих свойств донных отложений, вероятно, является, бенз(а)пирен. Прооксидантные эффекты, по всей видимости, обусловлены суммарным содержанием ПАУ.

7) Биоразнообразие культивируемых углеводород-деградирующих бактерий, выделенных из почв и донных отложений импактной зоны

Новочеркасской ГРЭС, представлено четырьмя родами актинобактерий и одним родом гаммапротеобактерий. Были идентифицированы штаммы *Rhodococcus erythropolis*, *Oerskovia turbata*, *Isoptericola* sp., *Arthrobacter aureescens*, *Arthrobacter polychromogenes*, *Arthrobacter sulfonivorans*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas brassicacearum*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida*.

8) Выделенные микроорганизмы-деструкторы способны генерировать активные формы кислорода в процессе биотрансформации углеводов. Генерация супероксид-анион радикала в присутствии углеводов у различных штаммов увеличивалась от 1,5 до 87 раз, концентрация пероксида водорода возрастала от 3 до 178 раз. Показано накопление пероксида водорода в среде культивирования в процессе биотрансформации углеводов микроорганизмами-деструкторами.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ ХМЕЛЕВЦОВОЙ Л.Е., ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Сазыкина М.А., Кудеевская Е.М., Костина Н.В., Сазыкин И.С., Хмелевцова Л.Е., Хаммами И.Х. Исследование динамики загрязнения воздуха г. Ростова-на-Дону генотоксичными веществами с использованием биоломинесцентных сенсоров // Валеология. – 2013. - № 3. - С. 21– 25.
2. Селиверстова Е.Ю., Сазыкин И.С., Хмелевцова Л.Е., Майоров Е.Л. Специфические методики детекции АФК в биологических системах // Валеология. – 2014. - № 4. – С. 26– 4.
3. Сазыкина М.А., Сазыкин И.С., Хмелевцова Л.Е., Селиверстова Е.Ю., Карчава Ш.К. Журавлева М.В., Кудеевская Е.М. Оценка загрязнения донных отложений Нижнего Дона методами биотестирования и химического анализа // Валеология. – 2016. - № 4. – С. 5-12.

Статьи в изданиях, индексируемых в базах Scopus и Web of Science:

4. Khmelevtsova L.E., Sazykin I.S., Sazykina M.A., Seliverstova E.Yu. Prokaryotic cytochromes P450 (Review) // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2017. – V. 53(4) - P. 401-409. doi:10.1134/S0003683817040093
5. Sazykin I.S., Sazykina M.A., Khammami M.I., Kostina N.V., Khmelevtsova L.E., Trubnik R.G. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of lower reaches of the Don River (Russia) and their ecotoxicologic assessment by bacterial lux-biosensors // Environmental Monitoring and Assessment. – 2015. – V. 187(5). –DOI 10.1007/s10661-015-4406-9
6. Sazykin I.S., Sazykina M.A., Khmelevtsova L.E., Khammami M.I., Karchava Sh.K., Zhuravleva M.V., Kudееvskaya E.M. Expression of SOD and production of reactive oxygen species in *Acinetobacter calcoaceticus* caused by hydrocarbons oxidation // Annals of microbiology. – 2016. – V. 66(3). – P. 1039–1045. DOI 10.1007/s13213-015-1188-9
7. Sazykin I.S., Sazykina M.A., Khmelevtsova L.E., Mirina E.A., Kudееvskaya E.M., Rogulin E.A., Rakin A.V. Biosensor-based comparison of the ecotoxicological contamination of the wastewaters of Southern Russia and Southern Germany // International Journal of Environmental Science and Technology. - 2016. – V. 13(3). - P. 945-954. DOI 10.1007/s13762-016-0936-0
8. Sazykin I.S., Sazykina M.A., Khmelevtsova L.E., Seliverstova E.Yu., Karchava Sh. K., Zhuravleva M.V. Antioxidant enzymes and reactive oxygen species level of the *Achromobacter xylosoxidans* bacteria during hydrocarbons biotransformation // Archives of Microbiology. - 2018. – V. 200(7). – P. 1057–1065. DOI: 10.1007/s00203-018-1516-0

Базы данных:

9. Программный комплекс «База данных по биоразнообразию ПАУ-деградирующих микроорганизмов в почвах окрестностей Новочеркасской ГРЭС», свидетельство о регистрации электронного ресурса № 21252 / Сазыкин И.С., Хмелевцова Л.Е., Мирина Е.А., Кудеевская Е.М., Сазыкина М.А.; выдано 15.10.2015.
10. Программный комплекс «База данных по токсичности донных отложений Нижнего Дона», свидетельство о регистрации электронного ресурса № 20532 /

Кудеевская Е.М., Костина Н.В., Хаммами М.И., Хмелевцова Л.Е., Сазыкин И.С., Сазыкина М.А. № 50201450788; заявл. 03.09.2014; выдано 20.11.2014.

Статьи и тезисы в других изданиях:

11. Костина Н.В., Хмелевцова Л.Е., Швыдкая Е.В., Трубник Р.Г., Празднова Е.В., Хаммами И.Х. Оценка загрязнения сточных вод г. Ростова-на-Дону на основе биолюминесцентной тест-системы // Миссия молодежи в науке / Материалы научно-практической конференции на базе Южного федерального университета. Т. I. Естественные и технические науки. – Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета, 2012. – С. 157-158.

12. Л.Е. Хмелевцова, Н.В. Костина, Е.В. Швыдкая, Е.М. Кудеевская. Изучение генотоксичности и интегральной токсичности сточных вод г. Ростов-на-Дону и г. Мюнхен с помощью бактериальных lux-биосенсоров // Миссия молодежи в науке / Материалы научно-практической конференции на базе Южного федерального университета. Т. I. Естественные и технические науки. – Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета, 2012. – С. 190-191.

13. Хмелевцова Л.Е., Кудеевская Е.М., Костина Н.В., Бураева Е.А., Сазыкин И.С., Сазыкина М.А. Исследование генотоксичности проб атмосферного воздуха г. Ростова-на-Дону с помощью биолюминесцентных сенсоров // Труды Второй Всероссийской научной конференции (с международным участием) «Окружающая среда и устойчивое развитие регионов», г. Казань, 24-26 сентября 2013 г. – Т. 1 – Казань: Отечество, 2013. – С. 463-465.

14. Сазыкин И.С., Сазыкина М.А., Хмелевцова Л.Е., Сазыкина М.И. Оценка потенциала нефтеокисляющих микроорганизмов на основе определения активности каталазы и супероксиддисмутаза // Труды Второй Всероссийской научной конференции (с международным участием) «Окружающая среда и устойчивое развитие регионов», г. Казань, 24-26 сентября 2013 г. – Т. 1 – Казань: Отечество, 2013. – С. 146-148.

15. Сазыкин И.С., Хмелевцова Л.Е., Сазыкина М.А., Хаммами М.И. Генерация супероксид-аниона нефтеокисляющими микроорганизмами при биотрансформации углеводов // Материалы V Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины», г. Ростов-на-Дону, 3-5 октября 2013г. Ростов н/Д: Изд-во Южного Федерального Университета, 2013. – С. 411-412.

16. Хмелевцова Л.Е., Сазыкин И.С., Мирина Е.А., Майоров Е.Л., Сазыкина М.А. Биоразнообразии микроорганизмов-деструкторов ПАУ в почвах и донных отложениях импактной зоны Новочеркасской ГРЭС // Сборник статей VI Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (1–3 октября 2015 г., г. Ростов-на-Дону). - Ростов-на-Дону: изд-во Южного федерального университета, 2015. - С. 49-50.

17. Карчава Ш.К., Журавлева М.В., Хмелевцова Л.Е., Селиверстова Е.Ю., Сазыкина М.А. Оценка загрязнения городских почв методом биотестирования // Материалы Всероссийского семинара с международным участием «Радиационная и промышленная экология», г. Ростов-на-Дону, 21-26 апреля 2016 г. / Южный федеральный университет. - г. Ростов-н/Д: Изд-во Южного федерального университета, 2016. – С. 233–236.

18. Хмелевцова Л.Е., Майоров Е.Л., Селиверстова Е.Ю., Сазыкин И.С., Сазыкина М.А. Анализ видового разнообразия культивируемых микроорганизмов-

деструкторов ПАУ, выделенных из почв Новочеркасской ГРЭС // Материалы Всероссийского семинара с международным участием «Радиационная и промышленная экология», г. Ростов-на-Дону, 21-26 апреля 2016 г. /Южный федеральный университет. - г. Ростов-н/Д: Изд-во Южного федерального университета, 2016. – С. 279–281.

19. Карчава Ш.К., Журавлева М.В., Хмелевцова Л.Е., Селиверстова Е.Ю., Сазыкина М.А. Токсичность почв городов Ростовской области // Материалы Двадцать второй Всероссийской научной конференции студентов–физиков и молодых учёных г. Ростов-на-Дону, 21-28 апреля 2016 г. / Южный федеральный университет. - г. Ростов-н/Д: Изд-во Южного федерального университета, 2016. – С. 557-558.

20. Хмелевцова Л.Е., Сазыкин И.С., Селиверстова Е.Ю., Сарафанюк В.Н., Сазыкина М.А. Влияние активных форм кислорода, генерируемых нефтеокисляющими микроорганизмами, на процессы ремедиации углеводородных загрязнений // VIII Международная научно-практическая конференция "Экологические проблемы. Взгляд в будущее" СОЛ «Лиманчик» – БП и СОТ «Витязь» 8–11 сентября 2017 года / Южный федеральный университет. - г. Ростов-н/Д: Изд-во Южного федерального университета, 2017. – С. 484-487

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АФК - активные формы кислорода

НчГРЭС - Новочеркасская ГРЭС

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК - рибонуклеиновая кислота

ВКПМ - Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов