

density throughout the whole observation period lasting for 60 days. At both doses of soil hydrocarbon pollutants soil autorecovery potential was not realized to the full extent. Microflora of all examined physiologic-trophic groups was inhibited during 60 days of monitoring.

Поступила 20.02.2013 г.

УДК 541.182+631.436

А. Р. ЦЫГАНОВ¹, А. Э. ТОМСОН¹, Н. Е. СОСНОВСКАЯ¹,
Т. В. СОКОЛОВА¹, Ю. Ю. НАВОША¹, В. С. ПЕХТЕРЕВА¹,
А. С. САМСОНОВА², Г. М. ПЕТРОВА²

КОМПОЗИЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ ТОРФА И МИКРООРГАНИЗМОВ – ДЕСТРУКТОРОВ НЕФТИ ДЛЯ УСКОРЕНИЯ ДЕГРАДАЦИИ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ В ПОЧВЕ

¹ Институт природопользования НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
nature@ecology.basnet.by,

² Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
samsonova@mbio.bas-net.by, microbio@mbio.bas-net.by

В лабораторной коллекции культур-деструкторов ксенобиотиков отобраны четыре наиболее активных по иммобилизационной способности штамма микроорганизмов рода *Rhodococcus*. Проведена оценка нефтепоглощающей способности образцов верхового и низинного торфа, а также композитов на их основе и экспериментально подтверждена высокая деструктивная активность микроорганизмов при иммобилизации на композиционном материале, включающем торф верхового и низинного типов в соотношении 1:1. Показано, что его применение в условиях лабораторного опыта позволяет снизить загрязнение почвы нефтью на 98,2%, что на 20,8% выше, чем в фоновой почве.

Введение. Одной из наиболее типичных проблем современности является загрязнение нефтью и нефтепродуктами почвенного покрова территорий в результате аварийных ситуаций при добыче, транспортировке и переработке нефти, что приводит к экологическому и экономическому ущербу – падению урожайности сельскохозяйственных культур, уменьшению продуктивности лесов и лугов, изъятию из хозяйственного землепользова-

ния значительных площадей плодородных земель. Поскольку на современном уровне развития нефтедобывающей и нефтеперерабатывающей промышленности не представляется возможным исключить ее воздействие на окружающую среду, возникает необходимость разработки новых и совершенствование существующих технологий рекультивации нефтезагрязненных почв. В связи с разнообразием почвенно-климатических условий и стоимости мероприятий по рекультивации проблема поиска оптимальных и адаптированных к конкретным условиям методов остается весьма актуальной.

Разрушение нефти в почвенном биоценозе происходит под влиянием ряда факторов биологического (биодеградация, биотрансформация) и абиотического (химического, фотохимического) характера. Интенсификации процесса самоочищения можно добиться с помощью биотехнологических приемов, основанных на внесении микроорганизмов, потребляющих в качестве источника питания углеводороды нефти. К числу важных характеристик, определяющих эффективность культур микроорганизмов, используемых для создания композиционного биосорбционного материала, относится их деструктивная активность и иммобилизационная способность. Иммобилизация на торфяных носителях микроорганизмов – деструкторов нефти, интродуцируемых в почву с целью интенсификации процесса очищения, защищает их от воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды. Практика использования ряда микробных препаратов для удаления нефтяных загрязнений во многих странах подтвердила перспективность применения для этих целей активных штаммов микроорганизмов – деструкторов нефти. Иммобилизация клеток микроорганизмов на твердом носителе способствует повышению их биохимической активности и скорости деструкции загрязняющих веществ, защищает их от воздействия отрицательных факторов окружающей среды, а также увеличению площади контакта рабочего объема биомассы с метаболизируемым ею субстратом [1–5]. Выбор торфа в качестве носителя микроорганизмов-деструкторов нефти определяется не только его высокой нефтепоглощающей способностью, но и свойством сорбировать на своей

поверхности клетки микроорганизмов – деструкторов, обеспечивая тем самым тесный контакт их с субстратом. Более того, торф, будучи природным органогенным материалом, служит источником гумуса и элементов дополнительного питания для иммобилизованных на нем микроорганизмов-деструкторов, способствуя тем самым созданию условий, необходимых для восстановления почв, нарушенных в результате загрязнения.

Цель исследования – разработка состава композиционного материала на основе торфа и микроорганизмов-деструкторов для ускорения разложения нефти в почве.

Объекты и методы исследования. В качестве объектов отобраны 4 наиболее активных по иммобилизационной способности штамма – КП7, КП8, КП11, КП19. В лабораторных условиях осуществлено наращивание этих микроорганизмов в виде культуральной жидкости для экспериментальных исследований.

Общую численность микроорганизмов и количество микроорганизмов-деструкторов в почве учитывали методом серийных разведений при посеве в чашки Петри с агаризованной средой МПА и Е-8 (г/дм³: NaCl – 0,5; (NH₄)₂HPO₄ – 1,5; KH₂PO₄ – 0,7; MgSO₄ · 7H₂O – 0,8; нефть – 0,1; pH 7,3) соответственно. Для микробиологических исследований использовали 1 г почвы, которую растирали в стерильных условиях и вносили в 100 мл стерильной воды для приготовления серийных разведений.

Эффективность иммобилизации микроорганизмов-деструкторов на различных видах торфа установили экспериментально. Микроорганизмы, представленные культурами *Rhodococcus sp.*, предварительно иммобилизовали на образцах верхового (пушицевый, $R = 40\%$ и пушицево-сфагновый, $R = 20–25\%$) и низинного (тростниковый, $R = 35–40\%$ и осоковый, $R = 25–30\%$) торфа. Нефть в количестве 1% наносили на почву поверхностью. Препаратор, состоящий из 5 см³ культуральной жидкости и 7 г торфа, вносили в загрязненную нефтью почву. В 1 см³ культуральной жидкости содержалось $3,8 \times 10^9$ клеток микроорганизмов – деструкторов нефти. Эксперимент проводили при комнатной температуре, а влажность субстрата поддерживали на уровне 60% от полной влагоемкости почвы.

Для выявления влияния состава композиционного материала на степень деградации нефти в лабораторные сосуды емкостью 500 см³ вносили дерново-подзолистую воздушно-сухую почву массой 300 г, нефть – в количестве, соответствующем загрязнению в 100 ПДК (ПДК 50 мг/кг), торфяной носитель и культуру микроорганизмов-деструкторов – в соответствии с количеством внесенной нефти. Почву тщательно перемешивали, опыт проводили при комнатной температуре, а влажность субстрата поддерживали на уровне 60% от полной влагоемкости почвы. В качестве торфяного носителя использовали верховой магелланум-торф ($R = 20\%$) и низинный осоковый торф ($R = 30–35\%$).

Величину нефтепоглощения торфяного сорбента определяли весовым методом и выражали отношением массы поглощенной нефти к массе сорбента.

Остаточную концентрацию углеводородов нефти в проведенных экспериментах определяли в динамике через 7, 14, 21, 35 дней и на 0-е, 30-е, 60-е и 120-е сутки ИК-спектрофотометрическим методом, основанным на экстракции нефтепродуктов четыреххлористым углеродом с одновременной очисткой элюатов на оксиде алюминия в колонке. Содержание нефтепродуктов оценивали по интенсивности полос поглощения в интервале 2700–3100 см⁻¹ относительно базовой линии, проведенной в виде касательной к основанию пиков, соответствующих симметричным и асимметричным валентным колебаниям CH₂ и CH₃-групп.

Степень деградации нефти (S) рассчитывали по формуле

$$S = 100 - C/C_0 \cdot 100,$$

где C – конечная концентрация нефти, мг/л; C_0 – концентрация внесенной нефти, мг/л.

Результаты и их обсуждение. Влияние вида торфа на активность иммобилизованных микроорганизмов-деструкторов в процессе деградации нефти представлено в табл. 1.

Интродукция в загрязненную почву микроорганизмов – деструкторов нефти способствовала ускорению деструкции нефти на 7,6% за 35 сут. Наблюдение за влиянием типа носителя на активность иммобилизованных микроорганизмов-деструкторов,

внесенных в загрязненную почву, показало, что все использованные в эксперименте виды торфа могут быть с успехом использованы для создания композиционного материала.

Таблица 1. Активность иммобилизованных микроорганизмов-деструкторов на различных видах торфа в процессе деградации нефти

Вариант опыта	Остаточное содержание нефти, %				Степень деградации нефти за 35 суток, %
	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	35-е сутки	
Почва + нефть (контроль)	97,0	94,1	91,2	90,0	10,0
Почва + нефть + ассоциация микроорганизмов	85,8	93,0	87,1	82,4	17,6
Почва + нефть + торф пущевый + ассоциация микроорганизмов	92,9	85,3	76,4	64,1	35,9
Почва + нефть + торф пущево-сфагновый + ассоциация микроорганизмов	78,3	76,1	67,4	60,9	38,1
Почва + нефть + торф тростниковый + ассоциация микроорганизмов	91,1	82,3	74,7	61,7	38,3
Почва + нефть + торф осоковый + ассоциация микроорганизмов	78,3	73,9	65,2	56,2	43,5

Во всех вариантах опыта с использованием торфа в качестве носителя микроорганизмов нефть за 35 сут была разрушена более чем на 35%. Наиболее активно во все сроки наблюдения процесс деструкции нефти проходил в вариантах опыта, включающих использование материала, созданного на основе низинных видов торфа. Так при применении осокового торфа степень деградации нефти на 35-е сутки опыта составила 43,5%, что на 5–7% выше, чем в остальных вариантах.

Подбор торфа для получения композиционного материала осуществлялся в соответствии со следующими требованиями: используемый торф должен обладать достаточно высокой нефтепоглощающей способностью, а также являться потенциальным источником гумуса для очищаемой почвы. Использование торфа в качестве сорбента нефти и продуктов ее переработки предопределется прежде всего его микроструктурой, пористо-

стью и дисперсностью. Определяющим показателем сорбционной способности торфа по отношению к нефти является степень разложения, т. е. уровень гумификации исходного растительного материала. Таким образом, для защиты почвенных объектов от загрязнения нефтью оптимально использование торфа с малой степенью разложения. Однако уменьшение степени разложения напрямую связано с ухудшением ценности торфа как источника гумуса для очищаемых почв. Как правило, при использовании торфа в сельскохозяйственной практике предпочтение отдается торфу низинного типа из-за более высокого содержания гуминовых веществ и pH среды, близкой к нейтральной [6]. Это послужило основанием для предположения (в качестве рабочей гипотезы), что сочетание верхового и низинного торфа в составе композиционного материала будет способствовать интенсификации процесса деградации нефтяного загрязнения в почве.

Экспериментальная проверка этой гипотезы показала, что состав композиционного материала из 50% осокового и 50% магелланикум-торфа отличается средней величиной нефтепоглощения (табл. 2). Как показали предыдущие исследования, наличие 50% осокового торфа в составе композиционного материала позволяет использовать его для успешной иммобилизации микроорганизмов – деструкторов нефти.

Таблица 2. Нефтепоглощение композиционного материала различного состава

Состав композиционного материала	Нефтепоглощение, кг/кг
Магелланикум-торф ($R = 20\%$) – 100%	4,8
Осоковый торф ($R = 30–35\%$) – 100%	1,6
Магелланикум-торф 25% + осоковый торф 75%	2,4
Магелланикум-торф 50% + осоковый торф 50%	3,2
Магелланикум-торф 75% + осоковый торф 25%	4,0

Результаты исследований по влиянию состава композиционного материала на основе торфа и микроорганизмов-деструкторов на степень деградации нефти в почве в условиях лабораторного опыта представлены в табл. 3.

Таблица 3. Деградация нефти в почве в условиях лабораторного опыта

Вариант опыта	60-е сутки			120-е сутки		
	остаточное содержание нефти, мг/г	степень деградации, %	степень деградации, % к фону	остаточное содержание нефти, мг/г	степень деградации, %	степень деградации, % к фону
1. Фон – почва + нефть	1,20	76,0	–	1,13	77,4	–
2. Фон + 100% верховой торф	0,81	83,8	32,5	0,59	88,2	47,8
3. Фон + 100% верховой торф + культура	0,54	89,2	55,0	0,38	92,4	66,4
4. Фон + 100% низинный торф	0,71	85,8	40,8	0,38	92,4	66,4
5. Фон + 100% низинный торф + культура	0,47	90,6	60,8	0,05	99,0	95,6
6. Фон + 25% верховой торф + 75% низинный торф	0,54	89,2	55,0	0,45	91,0	60,2
7. Фон + 25% верховой торф + 75% низинный торф + культура	0,17	96,6	85,8	0,07	98,6	93,8
8. Фон + 50% верховой торф + 50% низинный торф	0,64	87,2	46,7	0,54	89,2	52,2
9. Фон + 50% верховой торф + 50% низинный торф + культура	0,22	95,7	81,7	0,09	98,2	92,0
10. Фон + 75% верховой торф + 25% низинный торф	0,80	84,0	33,3	0,69	86,2	38,9
11. Фон + 75% верховой торф + 25% низинный торф + культура	0,39	92,2	67,5	0,35	93,0	69,0

Как следует из данных, представленных в табл. 3, наиболее высокие уровни степени деградации нефти отмечались при применении составов с преимущественным содержанием низинного торфа. Повышение доли верхового торфа в композиционном материале приводит к некоторому снижению этого показателя. Так, степень деградации нефти относительно фона составила 92–95% в вариантах с использованием более 50% низинного торфа и 66–69% с использованием более 50% верхового торфа.

Согласно данным табл. 4, 5 как наибольшее количество микроорганизмов – деструкторов нефти, так и более высокая общая численность микроорганизмов отмечались в вариантах с преобладанием низинного торфа в составе композиционного материала.

Таблица 4. Динамика общей численности микроорганизмов в почве модельно загрязненной нефтью

Вариант опыта	Количество микроорганизмов – деструкторов нефти, 10 ⁶ КОЕ/мл		
	0-е сутки	30-е сутки	60-е сутки
1. Фон – почва + нефть	78,76 ± 0,44	10,38 ± 0,03	15,39 ± 0,07
3. Фон + 100% верховой торф + культура	61,80 ± 8,33	19,35 ± 1,37	15,06 ± 2,01
5. Фон + 100% низинный торф + культура	87,00 ± 7,00	19,93 ± 0,83	17,12 ± 0,91
9. Фон + 50% верховой торф + 50% низинный торф + культура	51,46 ± 3,04	20,00 ± 0,70	26,32 ± 0,18

Таблица 5. Динамика численности микроорганизмов – деструкторов нефти в почве модельно загрязненной нефтью

Вариант опыта	Количество микроорганизмов – деструкторов нефти, 10 ⁶ КОЕ/мл		
	0-е сутки	30-е сутки	60-е сутки
1. Фон – почва + нефть	11,16 ± 0,41	10,95 ± 0,43	13,39 ± 0,44
3. Фон + 100% верховой торф + культура	79,98 ± 9,69	42,35 ± 3,88	5,99 ± 0,03
5. Фон + 100% низинный торф + культура	86,16 ± 3,88	20,86 ± 0,73	12,11 ± 0,12
9. Фон + 50% верховой торф + 50% низинный торф + культура	193,60 ± 3,35	82,71 ± 1,38	34,79 ± 2,54

Резкое уменьшение количества микроорганизмов-деструкторов к 60-м суткам наблюдений согласуется с высокими значениями степени разложения нефти в этих вариантах и объясняется угнетением роста ассоциаций нефтедеструкторов вследствие дефицита источника питания в виде остаточного содержания нефти в почве.

Учитывая необходимость сочетания сорбционных свойств и деструктивной активности композиционного материала, на основании данных табл. 3, 4, при создании нового композиционного материала в качестве носителя для иммобилизации микроорганизмов – деструкторов нефти был выбран состав из 50% верхового и 50% низинного торфа.

Заключение. На основании проведенных исследований разработан состав композиционного материала для интенсификации разложения нефтяных загрязнений в почве. Показано, что применение композиционного материала в условиях лабораторного опыта в сочетании с микроорганизмами – деструкторами нефти позволило снизить степень загрязнения почвы на 98,2%, что на 20,8% выше, чем в фоновой почве.

Литература

1. Использование органических добавок для стимуляции аборигенной микрофлоры нефтезагрязненной серой лесной почвы / И. М. Габассова [и др.] // Экобиология: борьба с нефтяными загрязнениями окружающей среды: тез. докл. конф. – Пущино, 2001. – С. 50–52.
2. Рекультивация серой лесной почвы, загрязненной нефтяным шламом / И. М. Габассова [и др.] // Нефтяное хозяйство. – 2001. – № 7. – С. 81–84.
3. Микробная деградация нефти и нефтепродуктов / З. И. Финкельштейн [и др.] // Биотехнология защиты окружающей среды: тез. докл. конф. – Пущино, 1994. – С. 5–6.
4. Способ биологической очистки почв от токсических органических соединений: заявка 96107454/13 Россия, МПК⁶ В 09 C1/10 / Г. К. Васильева, Э. Г. Суровцева, Л. П. Бахаева, В. Н. Башкин; заявитель Ин-т почвоведения и фотосинтеза РАН. – № 96207454/13; заявл. 15.04.96; опубл. 10.10.98. // Изобрет. – 1998. – № 28. – С. 40.
5. Влияние некоторых факторов окружающей среды на выживаемость внесенных бактерий, разрушающих нефть / З. М. Ермоленко [и др.] // Биотехнология. – 1997. – № 5. – С. 33–38.
6. Торф на удобрение/ А. В. Тишкович [и др.]. – Минск: Наука и техника, 1983. – 103 с.

A. R. TSYGANOV¹, A. E. THOMSON¹, N. E. SOSNOVSKAYA¹, T. V. SOKOLOVA¹, YU. YU. NAVOSHA¹, V. S. PEKHTEREVA¹, A. S. SAMSONOVA², G. M. PETROVA²

COMPOSITE MATERIAL BASED ON PEAT AND ACTIVE MICROBIAL STRAINS TO ACCELERATE DEGRADATION OF OIL POLLUTANTS IN SOIL

¹ Institute for Nature Management, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus, nature@ecology.basnet.by,

² Institute of Microbiology, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus, samsonova@mbio.bas-net.by, microbio@mbio.bas-net.by

4 strains of genus *Rhodococcus* showing the highest immobilization capacity were selected among xenobiotic-degrading cultures deposited at lab collection. Oil-absorbing and oxidizing potential of top and low-lying peat samples and the derived compositions was evaluated. High decomposing activity of microorganisms immobilized on composite support comprising both peat types at 1:1 ratio was confirmed experimentally. Its application in lab test conditions was shown to decrease oil pollution degree by 98.2%, which is 20.8% superior to native soil process.

Поступила 15.02.2013 г.

СОДЕРЖАНИЕ

Коломиец Э. И., Ракецкая О. А. Состояние и перспективы развития биотехнологии в Республике Беларусь.....	3
МИКРОБНЫЙ СИНТЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ. ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ. КОЛЛЕКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ.....	10
Белова Л. А., Мошенцева В. Н. Биологические коллекции Российской Федерации	10
Береснев А. И., Квач С. В., Сивец Г. Г., Зинченко А. И. Синтез 3'-фтор-2',3'-дизоксигуронозина с использованием рекомбинантных бактериальных ферментов	19
Блиева Р. К. Новый метод длительного культивирования и селекции продуцентов ферментов	29
Ганбаров Х. Г., Мусаев Э. М., Ахмедов И. С., Рамазанов М. А., Эйвазова Г. М. Образование наночастиц с помощью микроорганизмов.....	39
Евтыхова Е. Б., Балтабекова А. Ж., Силаев Д. В., Шустров А. В. Разработка технологической платформы для получения синтетической фитазы в бактериальных системах экспрессии	50
Зинченко А. И., Рымко А. Н., Квач С. В. Создание системы регенерации АТФ для синтеза дезоксинуклеозидтрифосфатов	63
Ивишина И. Б., Куюкина М. С., Каменских Т. Н., Макаров С. О., Решетников Д. Г., Гайдуков Д. В. База данных о коллекционных штаммах актинобактерий – биодеструкторах углеводородных поллютантов. Кильчевский А. В., Сычева Е. А. Геномные биотехнологии: достижения и перспективы	71
Кирибаева А. К., Гаджимурадова А. М., Абельденов С. К., Силаев Д. В., Хасенов Б. Б. Получение рекомбинантного штамма, продуцирующего гидролазу APPA	81
Коровашкина А. С., Рымко А. Н., Квач С. В., Зинченко А. И. Конструирование рекомбинантного штамма <i>Escherichia coli</i> – продуцента гомологичной гуанилаткиназы и ее использование для синтеза ГТФ	96
105	