

Н.Г. Клишевич;
З.М. Алещенкова, д-р биол. наук, гл. науч. сотр.
(Институт микробиологии НАН Беларуси)

МИКРООРГАНИЗМЫ-ДЕСТРУКТОРЫ НЕФТИ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ ПОЧВЫ

Микроорганизмы – самая распространенная форма жизни на планете, являющаяся первым звеном в цепи эволюции и составляющие существенную часть земной биоты. Микроорганизмы распространены повсюду, их число на планете оценивается в $4-6 \cdot 10^{30}$ клеток, при этом их суммарная масса содержит до $350-550 \cdot 10^{15}$ г углерода. Такое широкое распространение означает, что мы всегда имеем дело и ними. В настоящее время существует несколько методологических подходов в оценке экологического состояния почв, но наиболее чувствительным является микробиологический метод. Микробиота настолько полифункциональна, что, участвуя в противоположных реакциях, осуществляет стабилизирующую функцию метаболического равновесия в природе. За счет большой поверхности контакта со средой, микроорганизмы очень чувствительны к изменяющимся условиям существования и благодаря высокой скорости размножения позволяет в короткий срок оценить изменения, возникающие под влиянием экологических факторов. В основном в почве окислительно-восстановительные реакции имеют биохимическую природу и связаны с микробиологическими процессами [1,2].

Интенсивное развитие нефтедобычи позволило обратить внимание на тот факт, что периодически происходят аварийные разливы нефтепродуктов в окружающую среду. Нефтяное загрязнение приводит к формированию в почве микробного сообщества, способного с высокой эффективностью ассимилировать углеводороды. Высокая численность углеводородокисляющих микроорганизмов сохраняется значительное время и даже в очищенной нефтезагрязненной почве с низкими концентрациями нефтепродуктов (менее 10 г/кг). Так, в почвенной среде загрязнение может быть поверхностное (глубина проникновения загрязнения 0–5 см), подповерхностное (0–30 см), глубинное (до 1 м), с проникновением до уровня грунтовых вод (1-5 м и более) [3,4].

Исследования последних десятилетий показали, что не все виды нефти и отходов поддаются полной биодеградации за счет воздействия атмосферных факторов, в первую очередь из-за наличия углеводородов с высокой молекулярной массой, а также низкому содержа-

нию влаги и рН. Согласно классической схеме окисления углеводородов сначала идет их окисление до спиртов, эфиров, кетонов и далее до насыщенных и ароматических карбоновых кислот. Кроме этого, при разрушении нефтепродуктов в почве накапливаются продукты неполного окисления некоторых углеводородов, что ведет к появлению спиртов, альдегидов, карбоновых кислот, алифатических эфиров, аминокислот, ароматических кислот и других. Продукты неполного окисления повышают степень смачивания клеточной поверхности УВ, что обеспечивает их диффузию через клеточную мембрану, и обладают поверхностно-активными свойствами, которые способствуют эмульгированию УВ в мелкие капли и поглощению этих капель микробными клетками [5].

Согласно литературным данным в результате биохимического окисления нефтяных фракций микрофлорой происходит не только их полное разрушение до CO_2 и H_2O , но и необратимая трансформация части углеводородов в компоненты почвенного гумуса, что повышает содержание углерода в почве. Наиболее легко микроорганизмы окисляют насыщенные алканы, так как с биохимической точки зрения они являются более доступными, чем остальные нефтяные углеводороды, несмотря на то, что они являются стойкими и мало химически активны. Из литературы известно, что скорость биодеградации углеводородов уменьшается в следующем порядке: нормальные алканы > разветвленные алканы > циклоалканы > простые ароматические углеводороды (бензол, толуол и др.) > изопреноиды > конденсированные полиароматические соединения. При этом на практике чаще сталкиваются с тем, что биодеструкция n-алканов составляет до 75 %, а более высокомолекулярных соединений (моно-, би-, триароматических и т.д.) – до 90 %. Вероятнее всего, причиной таких результатов является не биохимическое воздействие, а физические факторы [6].

Цель: оценить эффективность применения микробного препарата Родобел-ТН, представленного микроорганизмами-деструкторами *Rhodococcus ruber* 1НГ-30П, *Bacillus subtilis* 2-4-201N, *Rhodococcus wratislaviensis* Г-13 и *Bacillus sp.* 4НГ-ПСД и консорциума БП 1, представленного микроорганизмами-деструкторами *Bacillus sp.* БП 1.1 и *Gordonia alkanivorans* БП 1.2, для применения в биоремедиации нефтезагрязненных почв.

Результаты мониторинговых исследований, выполненных на территории Беларуси позволили выявить широкое распространение и высокие уровни загрязнения почв и почвогрунтов нефтепродуктами, содержание которых варьировалось от фоновых (менее 5 мг/кг) до высоких (более 100 000 мг/кг) значений. Выделенные из нефтезагрязнен-

ной почвы углеводородокисляющие микроорганизмы характеризовались высокой деструктивной активностью в отношении широкого круга ксенобиотиков, способны активно расти и разрушать нефть в концентрации 1-10%.

С целью изучения эффективности применения исследуемых микроорганизмов-деструкторов в условиях загрязнения почвы нефтью был заложен модельный опыт с использованием дерново-подзолистой почвы и 0,1% нефти (белорусской, плотность 0,91 г/см³ и российской, плотность 0,85 г/см³). Определение численности микроорганизмов-деструкторов проводили общепринятыми методами предельных разведений и посева на агаризованную синтетическую среду Е-8 с 0,1% гексадекана. Повторность опыта – трехкратная, продолжительность эксперимента – 4 месяца. Интродукцию микроорганизмов-деструкторов осуществляли из расчета 2,0-2,1·10⁹ КОЕ/100 г почвы. Количественное содержание нефти в почве определяли гравиметрическим методом с экстракцией хлороформом и гексаном.

В результате наблюдений было отмечено варьирование численности микроорганизмов-деструкторов нефти в разные сроки отбора образцов почвы. Численность нефтеокисляющих микроорганизмов до внесения препарата эксперимента не превышала 6,8·10⁵ КОЕ/г почвы. На протяжении всего модельного опыта отмечалось постепенное увеличение численности микроорганизмов-деструкторов. Через 4 месяца численность нефтеокисляющих микроорганизмов в варианте с препаратом Родобел-ТН достигла 0,98·10⁷ (с белорусской нефтью) и 1,07·10⁷ КОЕ/г почвы (с российской нефтью) соответственно. К концу эксперимента численность углеводородокисляющих микроорганизмов в варианте с консорциумом БП 1 составляла 0,96·10⁶ (с белорусской нефтью) и – 1,04·10⁷ КОЕ /г почвы (с российской нефтью) соответственно. К концу эксперимента деструкция нефти в контрольных вариантах с белорусской и российской нефтью составила 29,3 и 47,8% соответственно. В аналогичных вариантах с применением микробного препарата Родобел-ТН нефть разрушилась на 60,2 и 77,0% соответственно. Интродукция в загрязненную почву консорциума БП 1 обеспечила разрушение нефти на 58,6 и 76,4% соответственно. Также подтвердилось большая эффективность деструкции легких нефтей, к которым относится образец российской нефти, по сравнению с белорусским образцом, относящимся к категории тяжелых нефтей.

Аmplификация участка гена с использованием праймеров nifH-1F и nifH-1R показала, что специфический ПЦР-продукт размером ~ 430 п.о. есть только у положительного контроля (*Rhanella aquatilis* В-704) и у *Rh. wratislaviensis* Г13, а у остальных штаммов – отсутствует.

Исходя, из полученных данных можно утверждать, что *Rh. wratislaviensis* Г13 являются азотфиксаторам, так как у него присутствует ген *nifH*, который ответственен за синтез нитрогеназы. В результате проведенного биохимического анализа была выявлена способность исследуемых штаммов к продукции индолилуксусной кислоты. Продукция индолил-3-уксусной кислоты составляла 10,5; 7,2; 5,4; 5,2; 1,8 и 7,2 мкг/мл у штамма *Bacillus subtilis* 2-4-201 N, *Bacillus sp.* 4НГ-ПСД, *Rh. wratislaviensis* Г13, *Rh. ruber* 1НГ-30П, *Bacillus sp.* БП 1.1, соответственно. *Gordonia alkanivorans* БП 1.2 не образует индолил-3-уксусную кислоту. Исходя, из полученных данных можно утверждать, что исследуемые штаммы обладают ростстимулирующей активностью.

Таким образом, исследуемые микроорганизмы-деструкторы обеспечивают ускорение разрушения нефти в почве и могут быть использованы для минимизации последствий, связанных с аварийным загрязнением почвы нефтью. Положительное влияние микробного препарата на развитие растений свидетельствует о перспективности их использования в технологии биоремедиации почвы, обеспечивающей восстановление ее биологической активности и возвращение в сельскохозяйственный оборот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Microbes – Oilfield Enemies or Allies? / // Oilfield Review. Summer. – 2012. – V. 24, N. 2. – P.4–21.
2. Полещук, Т.О. Микробиологическая индикация почв над подземным хранилищем природного газа / Т.О. Полещук, Е. В. Плешакова, М. В. Решетников, И.С. Пальцев // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2015. – Т. 15. – Вып. 1. – С.75–81.
3. Пахарькова, Н.В. Оптимизация выбора растений для биоремедиации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами в условиях южной сибирей / Н. В. Пахарькова и др. // Вестник КрасГАУ. – 2015. – № 8. – С. 28–33.
4. Brzeszcz, J. R-Strategist versus K-Strategist for the application in bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils / J. Brzeszcz [et al.] // Intern. Biodeter. & Biodegrad. – 2016. – V. 106. – P. 41–52.
5. Филатов, Д.А. Биохимическое окисление газойля в модельной почвенной системе / Д.А. Филатов, Е.Б. Кривцов, Е.А. Ельчанинова, Л.К. Алтунина // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2015. – № 4. – С. 31–36.