

## **ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ БИОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ЭКОСИСТЕМ**

*В.С. Подгорский*

*Институт микробиологии и вирусологии  
им. Д.К.Заболотного НАН Украины,  
ул. Заболотного 154, Киев, Д 03680, Украина*

*Podgorsky@serv.imv.kiev.ua*

## Загрязнение почвенных и водных экосистем нефтью и нефтепродуктами



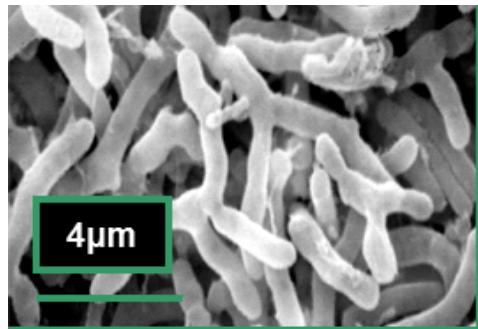
## **Высокая степень загрязнения нефтью и нефтепродуктами**

- - изменяет физико-химические свойства почвы;
- - активность ее основных ферментов;
- - замедляет развитие или вызывает гибель живых организмов почвы;
- - нарушает экологическое равновесие природных ландшафтов.

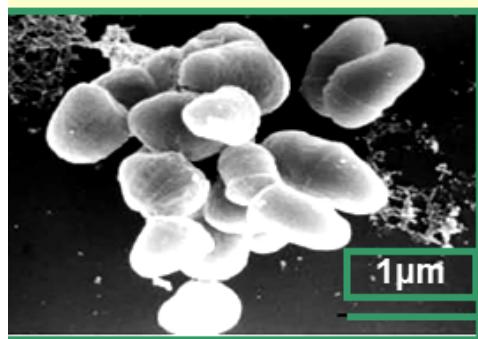
**В настоящее время наиболее эффективными признаны микробиологические методы биоремедиации нефтезагрязненных почв, основой которых является увеличение количества углеводородокислющих микроорганизмов в загрязненной среде.**

## **При ликвидации нефтяных загрязнений почв основными биологическими методами очистки являются**

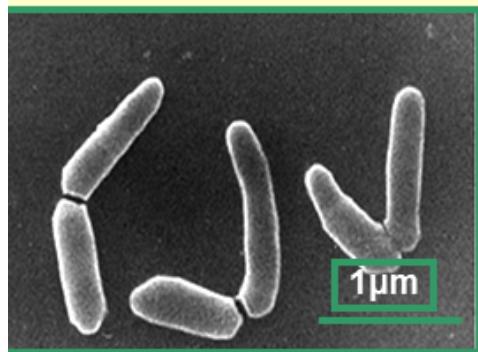
- 1. **Биостимуляция**, основанная на активизации метаболической активности природной аборигенной нефтеокисляющей микрофлоры, которая содержится в загрязненной почве, путем использования простых агротехнических приемов (рыхление, увлажнение и внесение минеральных удобрений)
- 2. **Биоаугментация**, которая заключается в добавлении в природную среду адаптированных к загрязнителю активных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов или биопрепаратов на их основе с одновременным внесением биогенных элементов.



*Rhodococcus*



*Dietzia*

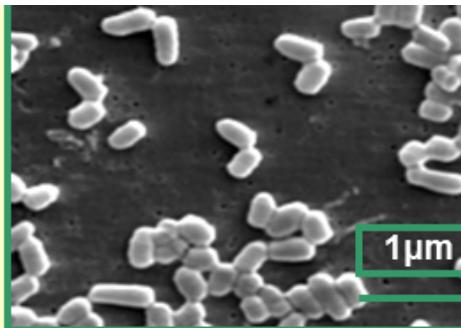


*Arthrobacter*

Анализ патентной литературы свидетельствует о том, что для очистки нефтезагрязненных сред наиболее часто используются актинобактерии родов *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Arthrobacter*, а также бактерии родов *Pseudomonas* и *Acinetobacter*. Исследованиями многих авторов установлено, что эти микроорганизмы наиболее широко распространены в загрязненных нефтью

экосистемах, в которых ведущую роль играют актинобактерии. Это объясняется метаболическими особенностями данных бактерий и их устойчивостью к неблагоприятным условиям существования.

1μm



*Gordonia*



*Pseudomonas*



*Acinetobacter*





*Rhodococcus*



*Dietzia*

На основе скрининга активных штаммов – деструкторов нефти среди изолированных и коллекционных штаммов углеводородокисляющих бактерий Украинской коллекции микроорганизмов нами были отобраны штаммы, которые принадлежат к видам:

*Rhodococcus erythropolis*

*Dietzia maris*

*Gordonia rubripertincta*

*Acinetobacter calcoaceticus*.

Отсутствие у этих штаммов взаимного антагонизма, патогенности и фитотоксичности свидетельствует о возможности их совместного использования в природных условиях.

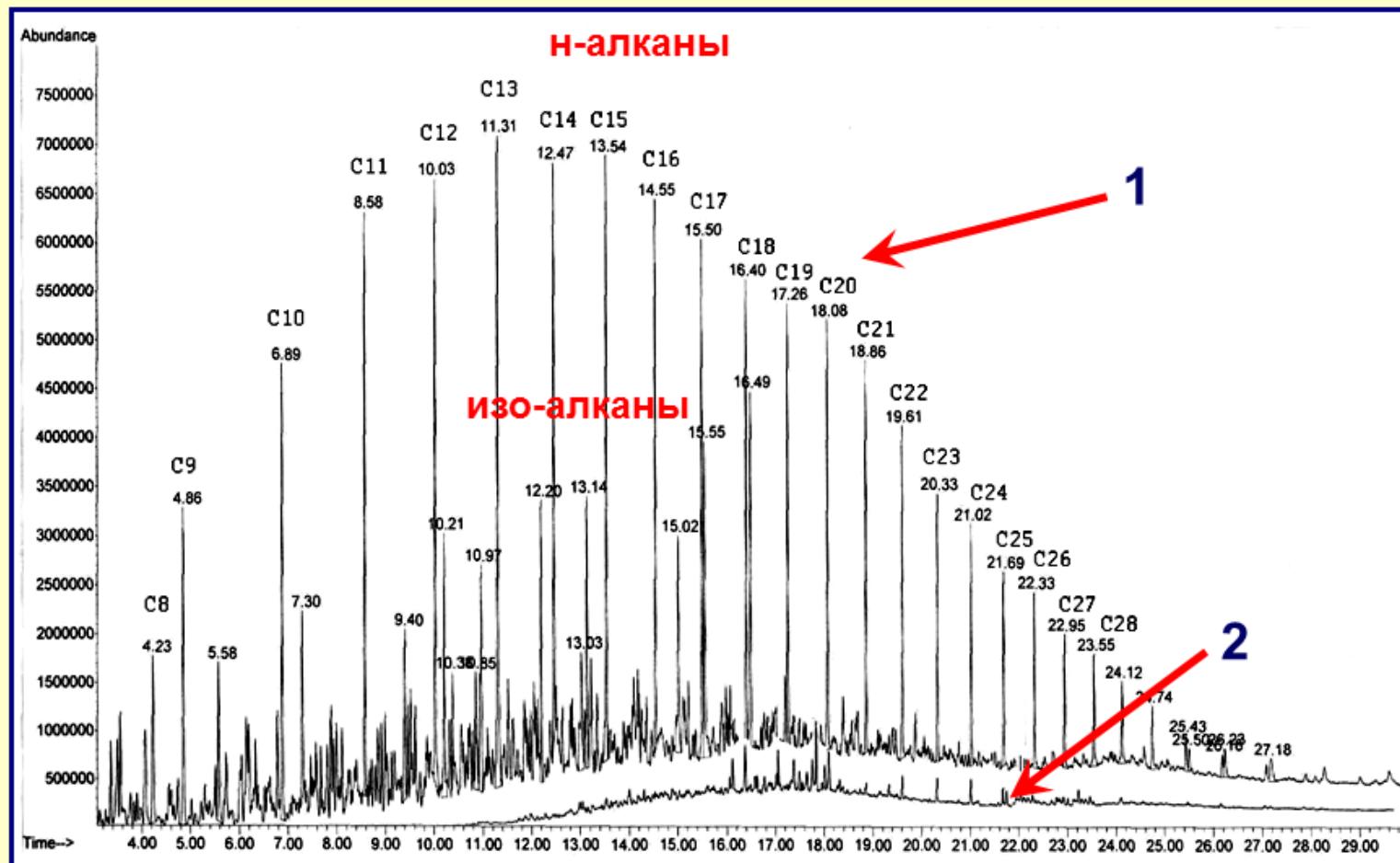


*Gordonia*

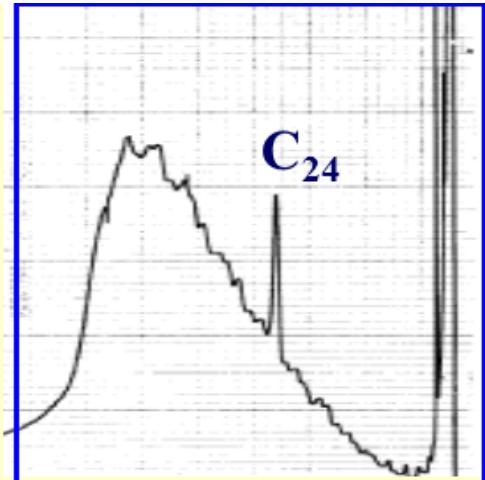


*Acinetobacter*

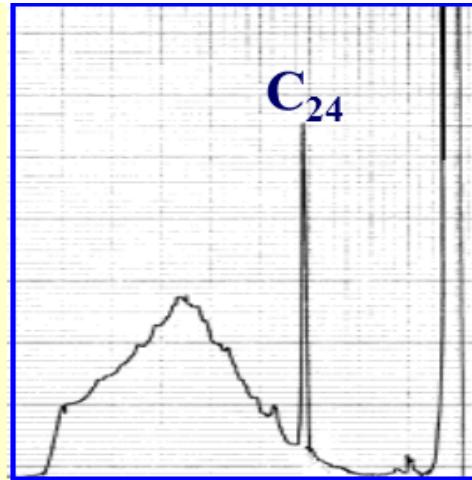
Методом хроматомассспектрометрии показано, что отобранные штаммы способны к утилизации почти всех компонентов нефти.



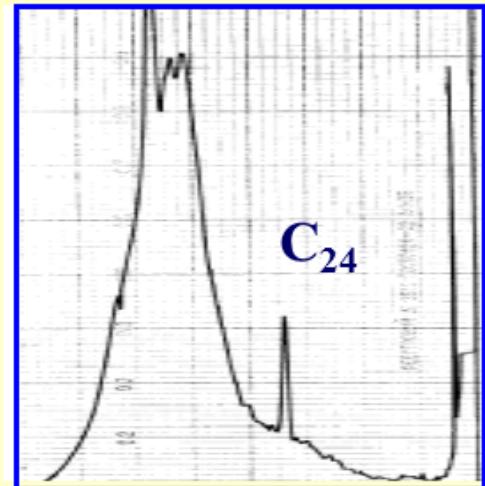
На рисунке представлен состав парафино-нафтеновых фракций исходной нефти (1) и нефти после культивирования штаммов (2).



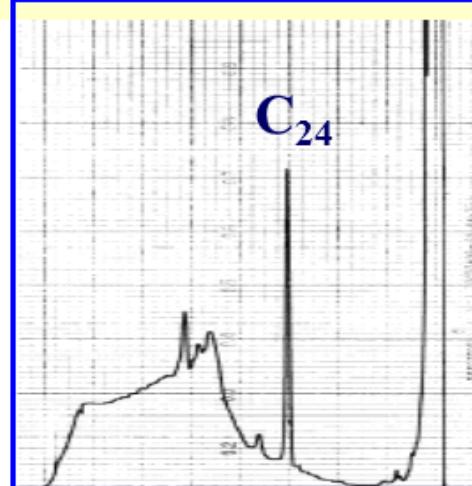
А →



Б



В →



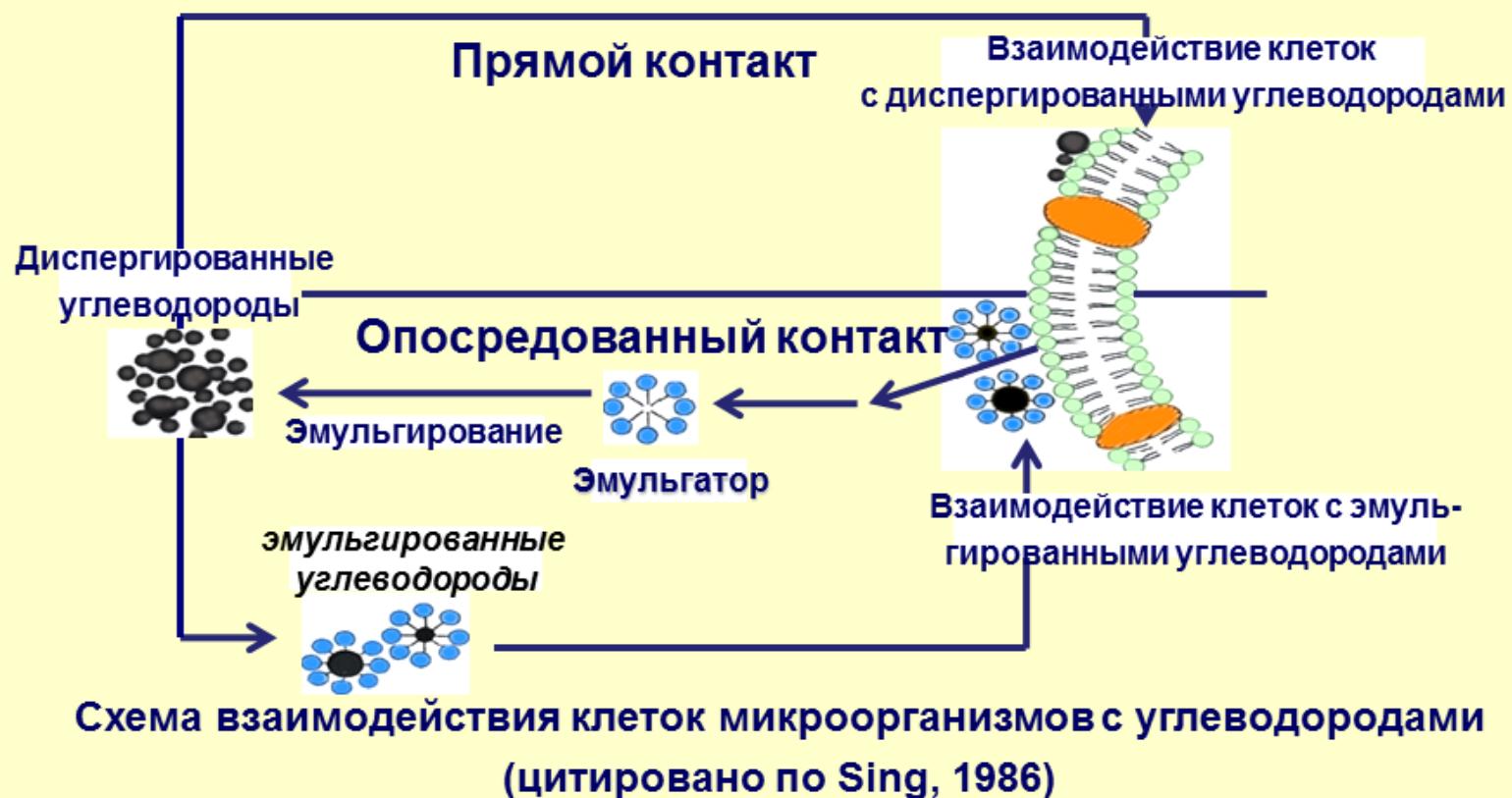
Г

## Деструкция минерального (А, Б) и синтетического (В, Г) моторных масел штаммами актинобактерий:

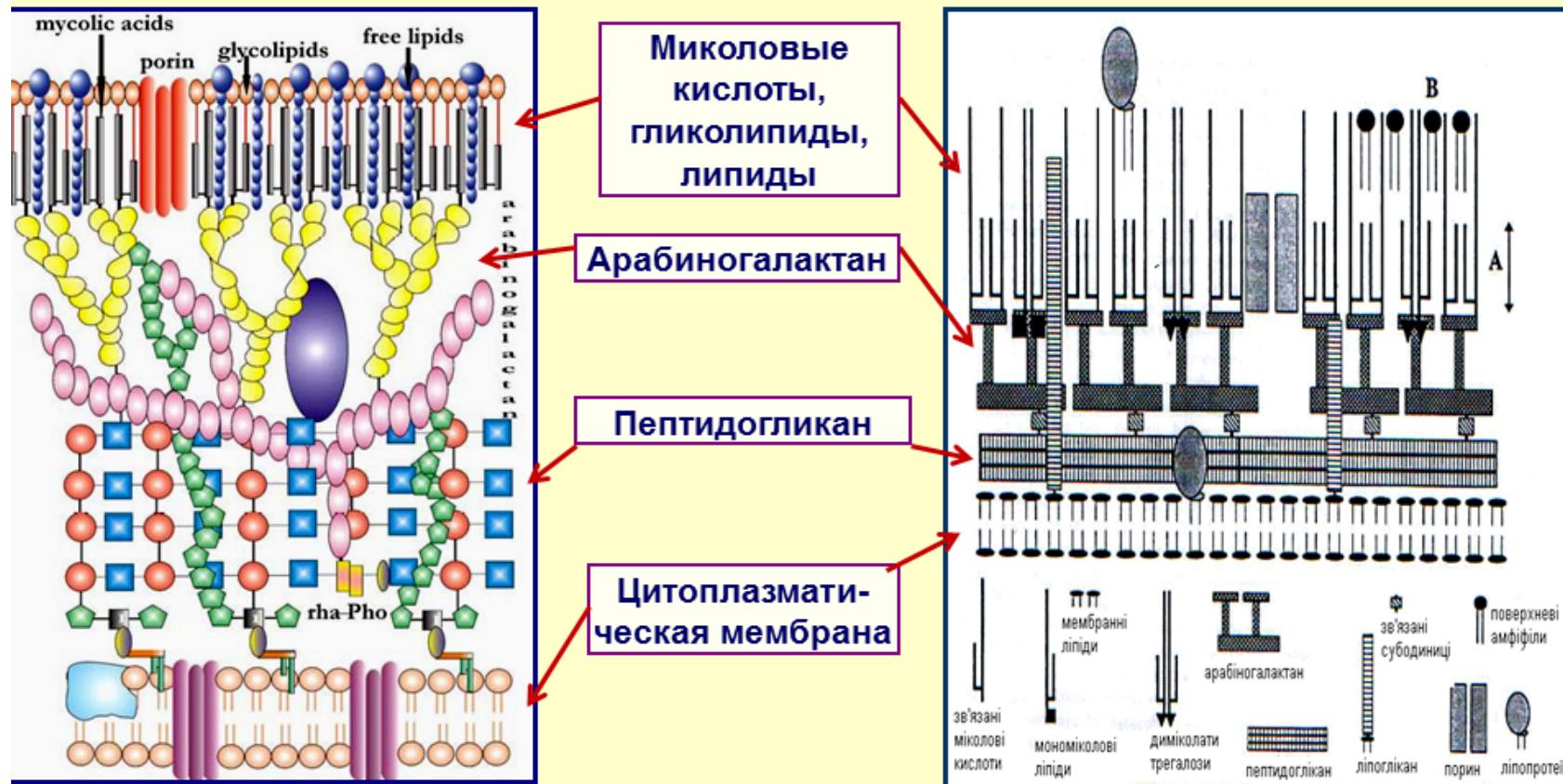
Хроматограмма масла „Азмол-Супер” до (А) и после (Б) инкубации со штаммом  
*G. rubropertinctus* УКМ Ас 179

Хроматограмма масла „Havoline Premium” до (Г) и после инкубации со штаммом  
*G. rubropertinctus* УКМ Ас 179. С<sub>24</sub> – внутренний стандарт

Известно, что усвоение углеводородов клетками микроорганизмов лимитируется гидрофобной природой этих веществ. Основными механизмами адаптации микроорганизмов к усвоению гидрофобных субстратов является: повышение уровня гидрофобности клеточной поверхности, что обеспечивает прямой контакт клеток с каплями углеводородов и /или синтез биосурфактантов, которые эмульгируют гидрофобный субстрат в ростовой среде и обеспечивают опосредованный контакт клеток с каплями углеводородов.



Уникальность актинобактерий состоит в том, что внешний липидный барьер проницаемости для гидрофобных субстратов в клетку у них формируют высокомолекулярные оксижирные кислоты - миколовые кислоты и их эфиры с трегалозой, которые способствуют проникновению углеводоров в клетку пассивно-диффузным путем.



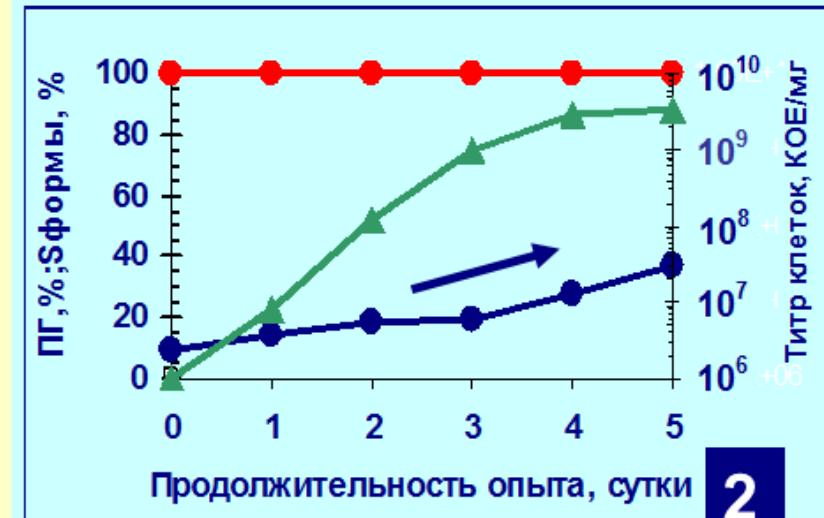
### Модель клеточной стенки родококков

Цитировано по I. C. Sutcliffe, 1998 and R. Benz, 2005

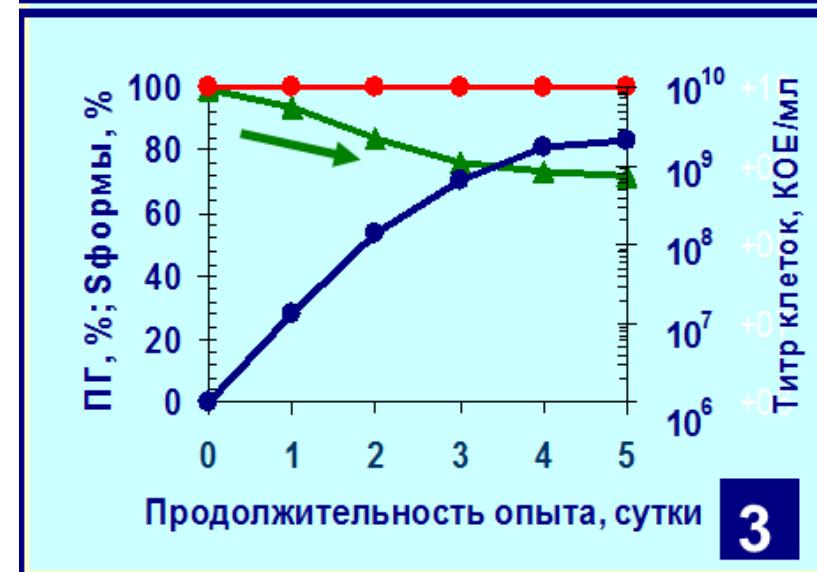
## Изменение гидрофобности клеточной поверхности исследованных штаммов при росте на углеводородах



1



2



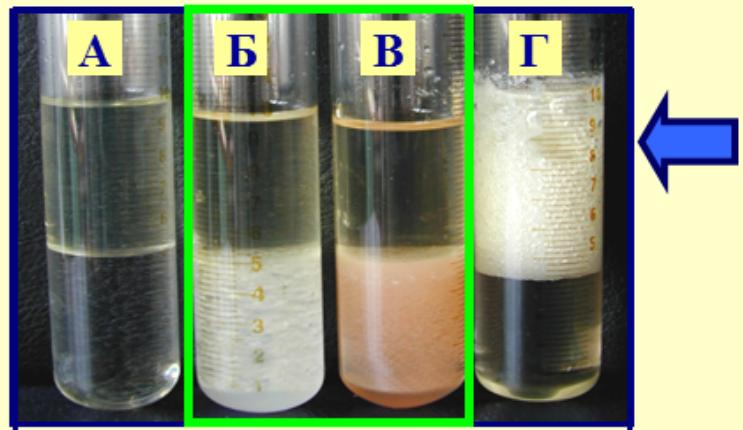
3

- 1 - *R. erythropolis*
- 2 - *G. rubripertincta*
- 3 – *A. calcoaceticus*

▲ – ПГ (показатель гидрофобности);  
● – количество S-форм;  
● – КОЕ (колониеобразующие единицы).

## Поверхностно-активные свойства штаммов-деструкторов углеводородов нефти

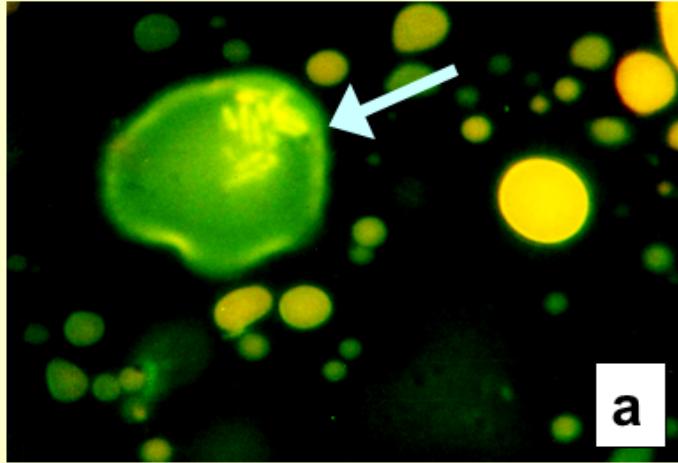
Штаммы	Индекс эмульгирования ( $E_{24}$ ), %		Поверхностное натяжение супернатанта культуральной жидкости, мН/м
	Супернатант КЖ	Суспензия клеток	
<i>Rhodococcus erythropolis</i> ИМВ В-7012	5,0±0,6	51,0±2,0	49,6±0,4
<i>Gordonia rubripertincta</i> ИМВ Ас-5005	4,0±0,5	54,0±3,2	45,8±0,5
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ИМВ В-7013	67,0±2,6	4,0±0,6	39,0±0,6



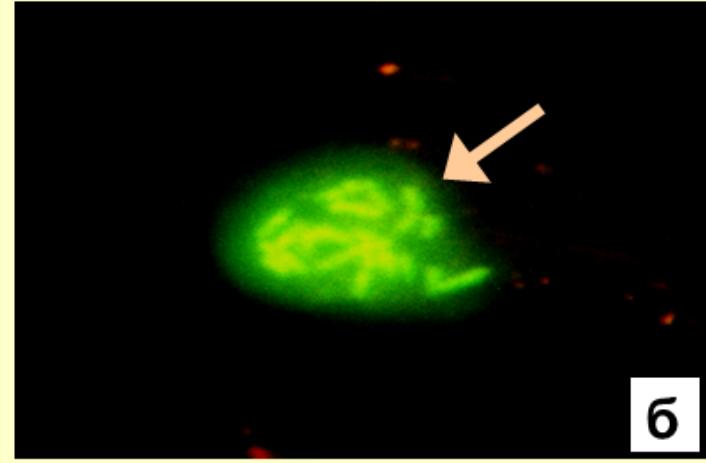
Типы эмульсий, которые образуют исследованные штаммы  
 А – контрольный образец  
 Б, В – эмульсия „масло в воде”  
 (*R. erythropolis* ИМВ В-7012  
*G. rubripertincta* ИМВ Ас-5005)  
 Г - эмульсия „вода в масле”  
 (*A. calcoaceticus* ИМВ В-7013).

## Компоненты биосурфактантов исследованных штаммов

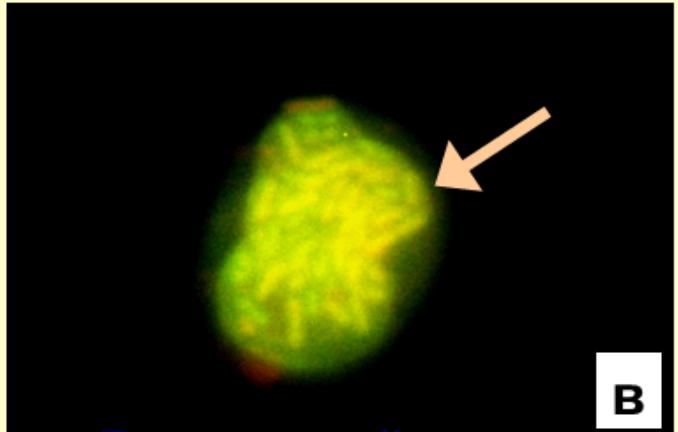
Вид, штамм	Компоненты биосурфактантов	Количество, г/л
<i>Rhodococcus erythropolis</i> <b>IMB B-7012</b>	Клеточносвязанные гликолипиды (мономиколаты и димиколаты трегалозы)	0,27
<i>Gordonia rubripertincta</i> <b>IMB Ac-5005</b>		0,29
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <b>IMB B-7013</b>	Внеклеточные гетерополисахариды	углеводы – 0,53 белки – 0,49 липиды – 0,18



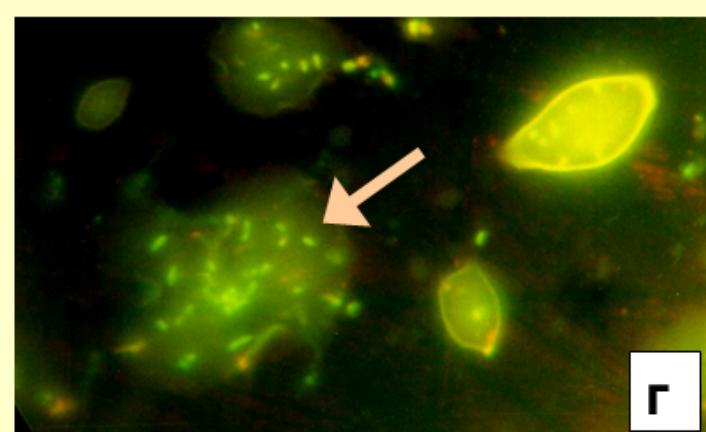
а



б



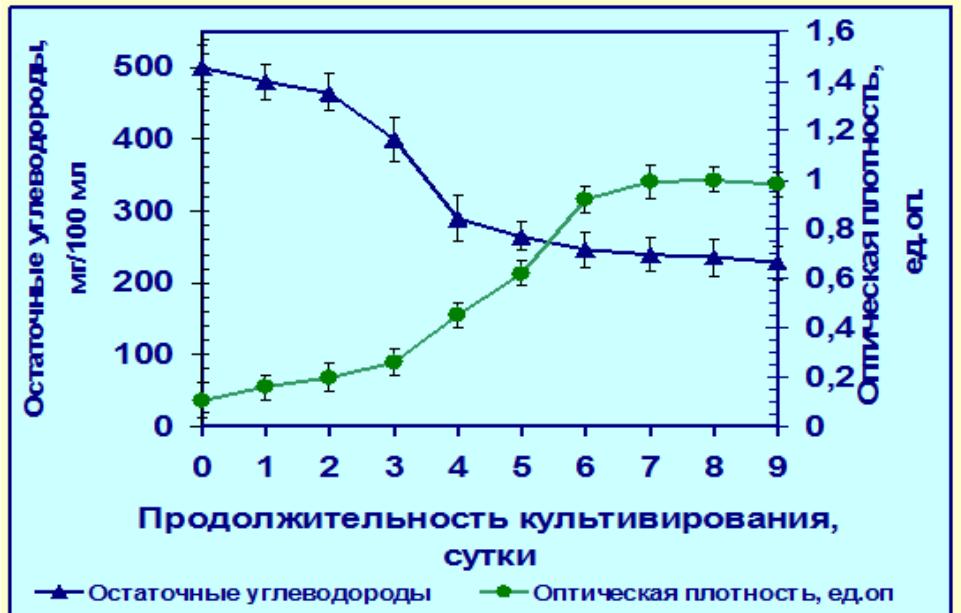
в



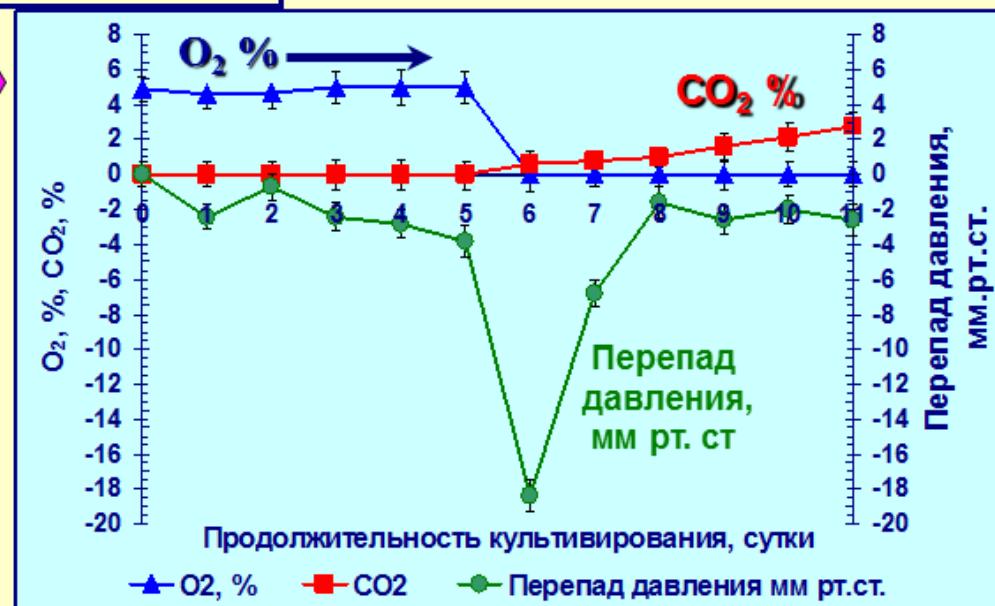
г

### Взаимодействие клеток родококков и гордоний с каплями углеводородов

- а - проникновение и развитие клеток в капле углеводорода (1-2 сутки роста)  
б, в - формирование микроколоний внутри капель (4-5 сутки роста)  
г - разрушение капель (7 сутки).



Рост и усвоение  
гексадекана при  
культивировании  
актинобактерий  
в микроаэробных условиях



Динамика изменений  
содержания O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> и  
перепад давления в газовой  
фазе при культивировании  
штаммов актинобактерий  
в микроаэробных условиях

**Созданные на основе исследованных штаммов биопрепараты «Родойл» и «Эколан-М» предназначены для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов**

<b>Компоненты</b>	<b>“Родойл”</b>	<b>“Эколан-М”</b>
<b>Микроорганизмы, количество жизнеспособных клеток, не меньше</b>	<i>Gordonia rubripertincta</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 10 <sup>8</sup> кл/г	<i>Gordonia rubripertincta</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Dietzia maris</i> 10 <sup>8</sup> кл/г
<b>Нафтепоглощающий сорбент</b>	Вермикулит	Древесный уголь
<b>Минеральное удобрение</b>	Комплексное азотно-фосфорно-калийное удобрение (нитроаммоfosка), 2 %	

**Почва после агротехнической обработки**



**Общий вид после биоремедиации**

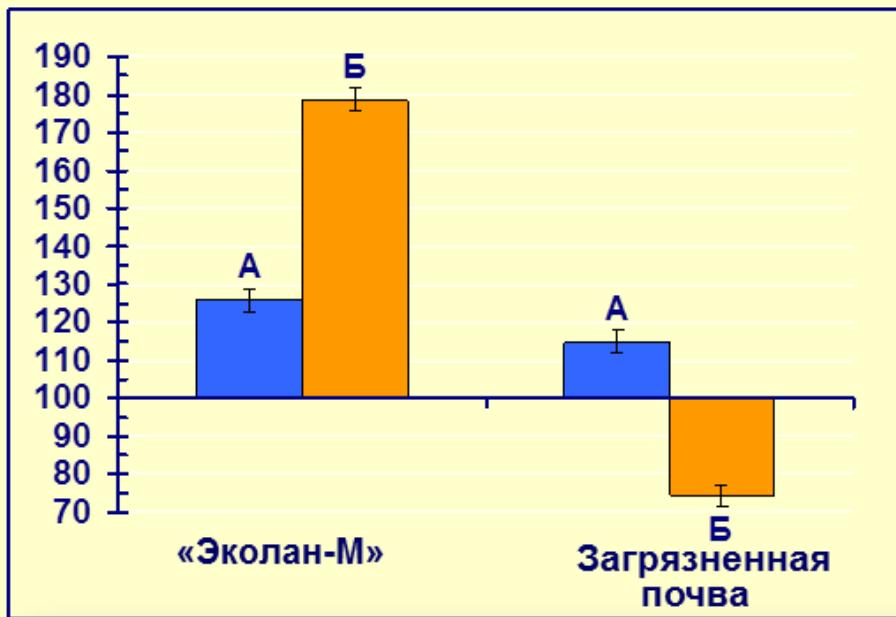


**Динамика численности гетеротрофных и углеводородокисляющих бактерий в загрязненной нефтью почве**

Варианты опыта	Дни				
	0	10	20	30	60
	Численность бактерий				
Гетеротрофные бактерии Почва + нефть	$2 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$6 \times 10^7$	$9,5 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$
Гетеротрофные бактерии Почва + нефть + препарат	$2 \times 10^7$	$6 \times 10^7$	$1 \times 10^8$	$6,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
Углеводородокисляющие бактерии Почва + нефть	$8 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	$5 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
Углеводородокисляющие бактерии Почва + нефть + препарат	$8 \times 10^3$	$6 \times 10^5$	$7 \times 10^6$	$8,8 \times 10^7$	$1,0 \times 10^4$

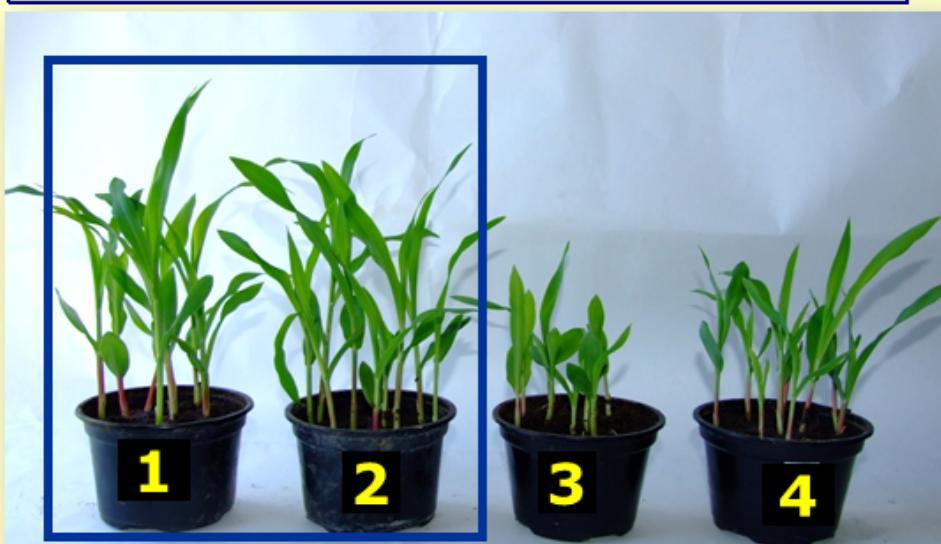
## Фитотоксичность почвы через один год биоремедиации

Прирост массы, % к контролю



А – корневая часть растения;  
Б – надземная часть растения.

16-е сутки роста



- 1 – почва, очищенная препаратом «Родойл»;
- 2 – почва, очищенная препаратом «Эколан-М»;
- 3 – загрязненная почва;
- 4 – чистая почва.

**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ**

