

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КОНСОРЦИУМОВ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ СРЕД, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЕПРОДУКТАМИ

А. А. Кремза

alyona.kremza@mail.ru;

Научный руководитель – М. И. Мандрик, кандидат биологических наук., доцент

В результате исследования установлено, что внесение питательных веществ в виде среды Мюнца с мелассой способствует активации местной микробиоты, присутствующей в загрязненной нефтепродуктами (более 180 000 мг/кг) почве, а также способствует повышению эффективности биodeградации. Внесение бактериального консорциума деструкторов не привело к значимому повышению эффективности биodeградации нефтепродуктов, однако способствовало восстановлению микробиоценоза загрязненной почвы.

Ключевые слова: биоремедиация; бактериальный консорциум; загрязнение нефтепродуктами; биodeградация; бактерии-деструкторы.

Одной из глобальных проблем, вызванных деятельностью человека, является загрязнение экосистем нефтью и нефтепродуктами. Углеводороды нефти по-прежнему используются в качестве основного источника энергии и являются наиболее опасными загрязнителями окружающей среды [1].

Несмотря на то, что в почве содержатся микроорганизмы, способные утилизировать нефтепродукты, самостоятельное восстановление почвы с помощью присутствующей в ней микробиоты малоэффективно из-за отсутствия поступления питательных элементов для стимуляции роста микроорганизмов, отсутствия постоянной аэрации почвы, необходимой для деградации нефтепродуктов и некоторых других факторов [2].

На сегодняшний день разработано достаточно много способов ремедиации (физические, химические, биологические) территорий, загрязненных нефтью и продуктами ее переработки. Биоремедиация является наиболее безопасным способом очистки окружающей среды от нефтепродуктов. Однако ее использование имеет ряд трудностей при крупномасштабном применении, именно поэтому актуальной задачей все еще является разработка различных способов повышения эффективности биоремедиации загрязненных экосистем, в частности, создание консорциумов бактерий-деструкторов, удаляющих высокие концентрации загрязнителя.

Целью данной работы являлось изучение эффективности биоремедиации почвы, загрязненной нефтепродуктами в высокой концентрации, с использованием бактериального консорциума.

Объектами исследования были консорциум, включающий бактерий – деструкторов углеводов родов *Rhodococcus* и *Bacillus*, а также почва, загрязненная нефтепродуктами (около 180 000 мг/кг), отобранная в месте разлива.

Для микробиологического анализа использовали среды ПДА (для учета общего числа гетеротрофов) и М9 [3] с дизельным топливом (для учета деструкторов нефтепродуктов). ПЦР-анализ детерминант, определяющих способность бактерий утилизировать углеводов, проводили с использованием праймеров, специфических к генам биodeградации нафталина *nahAc* [4], *nahG* [5], *narB* [6], алканов – *alkB* [7], *rep*-областям плазмид групп IncP-9 [8] и IncP-7 [8], которые часто несут гены биodeградации углеводов.

Для создания модельных почвенных систем использовали почву, загрязненную нефтепродуктами, смешанную с опилками в соотношении 5:1. Анализ содержания нефтепродуктов проводили гравиметрическим методом [9]. Культивирование бактерий-деструкторов для внесения в почву осуществляли в среде Мюнца [10] с 2 % мелассой. В опытные образцы вносили биопрепарат в концентрации 5 % (объем/масса). В контрольные образцы вносили соответствующий объем среды Мюнца без бактерий. Обработку проводили дважды (в начале эксперимента и через 14 сут.). Почву регулярно поливали и перемешивали.

В результате эксперимента в модельных почвенных системах наблюдалось значительное снижение концентрации нефтепродуктов, как в контрольных, так и в экспериментальных образцах. В течение первых 14 сут. эффективность деградации составляла – $(42,6 \pm 17,3) \%$ в контрольных образцах и $(20,7 \pm 14,7) \%$ - в экспериментальных. К 80 сут. эффективность деградации в экспериментальных образцах увеличилась до $(35 \pm 6,6) \%$, а в контрольных образцах она почти не изменилась и составила $(42,8 \pm 2,5) \%$.

В первые 14 сут. отмечалось повышение общего содержания гетеротрофных микроорганизмов в 10 раз (с $(1,6 \pm 0,8) \times 10^5$ до $(6,9 \pm 2,2) \times 10^6$ КОЕ/г) в контрольных образцах, однако после прекращения внесения дополнительных питательных веществ в контрольные образцы общее количество гетеротрофов снизилось почти до исходных значений ($(5,4 \pm 4,0) \times 10^5$ КОЕ/г). В экспериментальных образцах на протяжении всего времени эксперимента количество культивируемых гетеротрофных микроорганизмов увеличивалось (с $(1,0 \pm 4,6) \times 10^6$ КОЕ/г до $4,8 \times 10^6$ КОЕ/г на 14 сут. и к 80 сут. возросло до $(7,2 \pm 0,6) \times 10^6$ КОЕ/г). Таким образом,

внесение биопрепарата способствует восстановлению микробиоценоза загрязненной почвы.

Причиной, по которой в контрольном образце в первые 14 сут. наблюдается более эффективная деградация, может быть явление кометаболизма, обеспечиваемое наличием в почве аборигенной углеводородоокисляющей микробиоты. В образцы с контролем вносили среду Мюнца с мелассой, содержащую биогенные элементы и легко усваиваемые субстраты, при наличии которых может происходить окисление трудно разлагаемых углеводов (например полициклических ароматических углеводов) в результате кометаболизма [11]. Наличие аборигенных бактерий-деструкторов в почве установлено как в результате микробиологического, так и молекулярно-генетического анализа. Для выявления в почве микроорганизмов – деструкторов углеводов с помощью молекулярно-генетических методов проведен ПЦР-анализ метагеномной ДНК, выделенной из образцов почвы. Он позволил выявить гены биodeградации нафталина *nahG* и плазмиды группы IncP-7, которые нередко несут детерминанты биodeградации углеводов.

В опытные образцы мы добавляли биопрепарат, в котором бактериальные культуры уже некоторое время росли в питательной среде и израсходовали часть субстратов. Они были добавлены в достаточно высоких концентрациях, что могло способствовать возникновению конкуренции с местной микробиотой. Кроме того, интродуцируемым микроорганизмам необходимо адаптироваться к условиям и субстратам, присутствующим в почве, тогда как аборигенная микробиота уже приспособлена к ним. В то же время, необходимо отметить, что к 80 сут. эффективность деградации в контрольных и экспериментальных образцах отличалась незначительно.

Библиографические ссылки

1. Шамраев А. В., Шорина Т. С. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды // Вестник ОГУ. 2009. № 6 (100). С. 642-645.
2. Янин Е. П. Ремедиация территорий, загрязненных химическими элементами: общие подходы, правовые аспекты, основные способы // Проблемы окружающей среды и природных ресурсов. 2014. Вып. 3. С. 3-105.
3. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / пер. с англ.: Ю.Н. Зографа [и др.]; под ред. и с предисл. С.И. Алиханяна. – М. : Мир, 1976.
4. Coexistence of two distinct copies of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas* strains isolated from the western Mediterranean region / M. Ferrero [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. 2002 Vol. 68, № 2. P. 957-962.
5. Разнообразие генетических систем биodeградации нафталина у штаммов *Pseudomonas fluorescens* / Т.Ю. Измалкова [и др.] // Микробиология. 2005. Т. 74, № 1. С. 70–78.

6. Detection of genes for alkane and naphthalene catabolism in *Rhodococcus* sp. strain 1BN / V. Andreoni [et al.] // Environ. Microbiol. 2000. Vol. 2, iss. 5. P. 572-577.
7. Kloos K., Munch J. Ch., Schloter M. A new method for the detection of alkane-monoxygenase homologous genes (*alkB*) in soils based on PCR-gybridization // J. Microbiol. Methods. 2006. Vol. 66. P. 486-496.
8. PCR primers for detection and characterization of IncP-9 plasmids / R. Krasowiak [et al.] // FEMS Microbiology Ecology. 2002. Vol. 42, № 2. P. 217–225.
9. Другов Ю. С., Родин А. А. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов. Практическое руководство: 2-е изд., перераб. и доп. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009.
10. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.А. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ при культивировании *Rhodococcus erythropolis* // Микробиология. 2010 Т. 46 С. 651–658.
11. Бабошин М. А., Финкельштейн З. И., Головлева Л. А. Кометаболизм флуорена культурами *Rhodococcus rhodochrous* и *Pseudomonas fluorescens* // Микробиология, 2003. Т. 72, № 2. С. 194-198.