



# **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



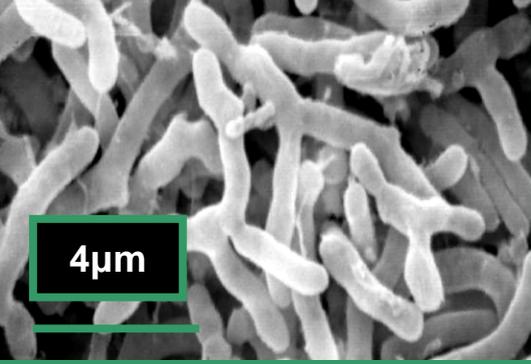
## **Высокая степень загрязнения нефтью и нефтепродуктами**

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

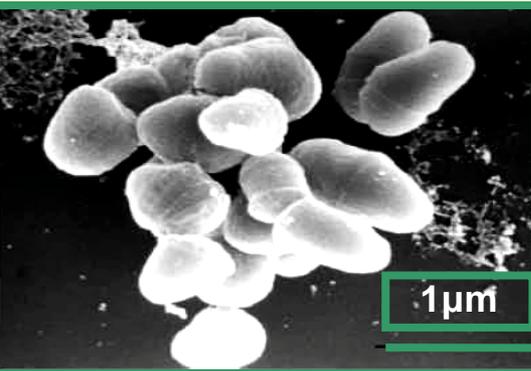
**В настоящее время наиболее эффективными признаны микробиологические методы биоремедиации нефтезагрязненных почв, основой которых является увеличение количества углеводородокисляющих микроорганизмов в загрязненной среде.**

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

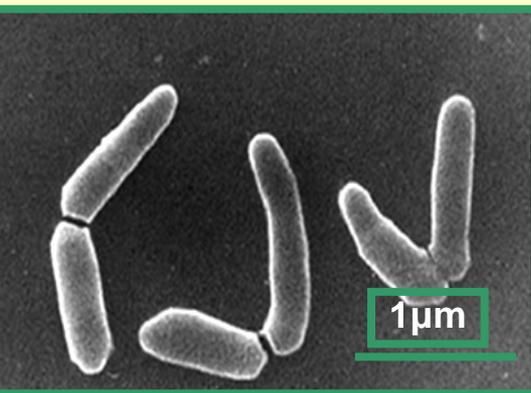
- **1. Биостимуляция, основанная на активизации метаболической активности природной аборигенной нефтеокисляющей микрофлоры, которая содержится в загрязненной почве, путем использования простых агротехнических приемов (рыхление, увлажнение и внесение минеральных удобрений)**
- **2. Биоаугментация, которая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



**Rhodococcus**

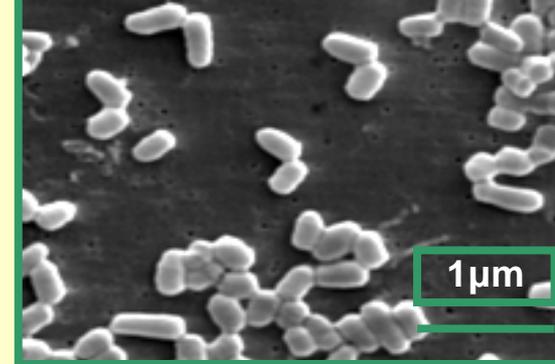


**Dietzia**

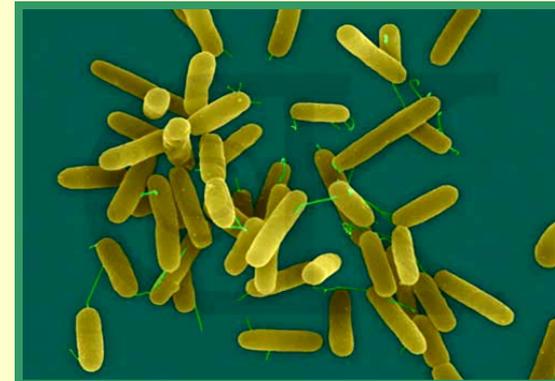


**Arthrobacter**

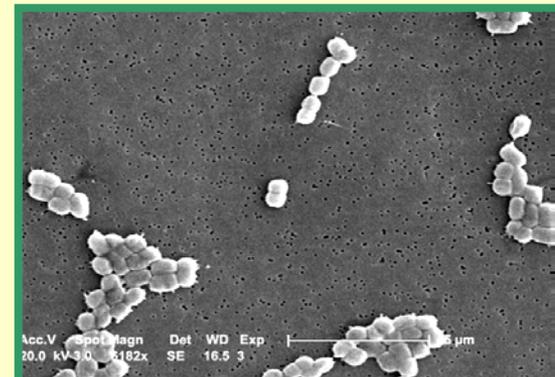
Анализ патентной литературы свидетельствует о том, что для очистки нефтезагрязненных сред наиболее часто используются актинобактерии родов *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Arthrobacter*, а также бактерии родов *Pseudomonas* и *Acinetobacter*. Исследованиями многих авторов установлено, что эти микроорганизмы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



**Gordonia**



**Pseudomonas**



**Acinetobacter**

*R. rhodochrous*

*R. flavus*

*G. terrae*

*R. equi*

*Dietzia maris*

*R. longus*

*R. aquosus*

*R. ruber*

*R. opacus*

*Rhodococcus erythropolis*

*R. fascians*

*Gordonia rubripertincta*

Распространение видов  
актинобактерий в почве  
загрязненной нефтью



***Rhodococcus***

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*

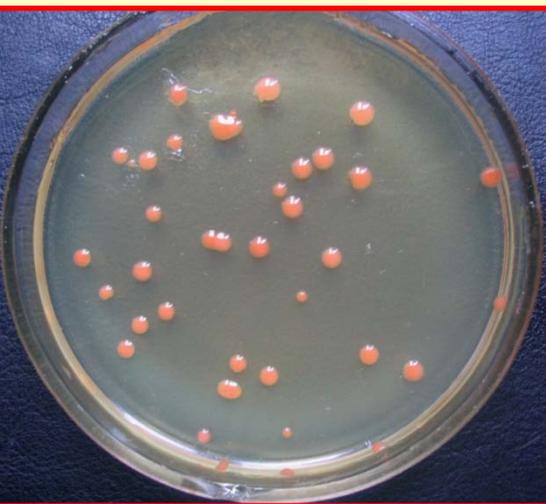
*Gordonia rubripertincta*

*Acinetobacter calcoaceticus.*

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



***Gordonia***

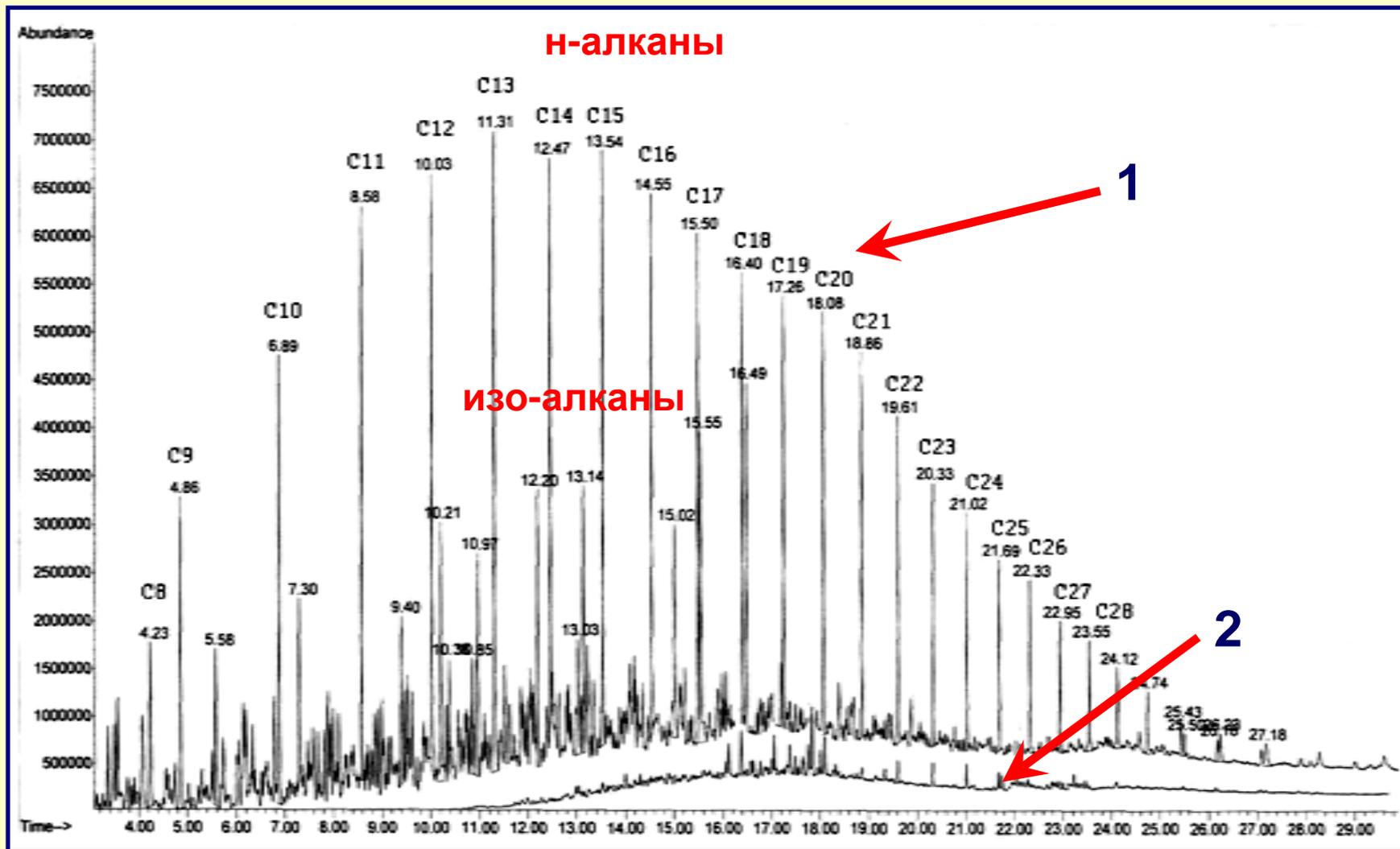


***Dietzia***

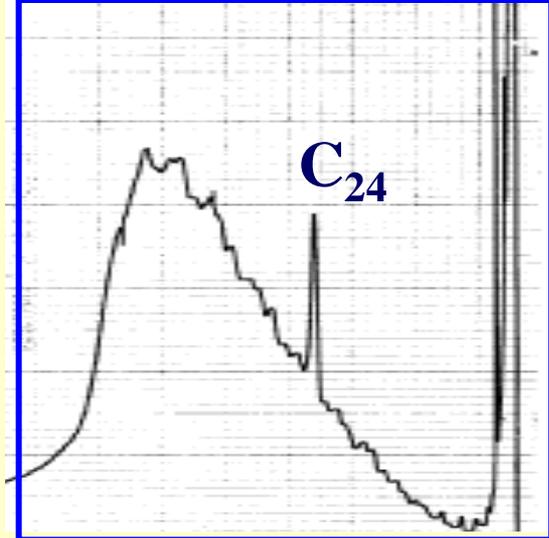


***Acinetobacter***

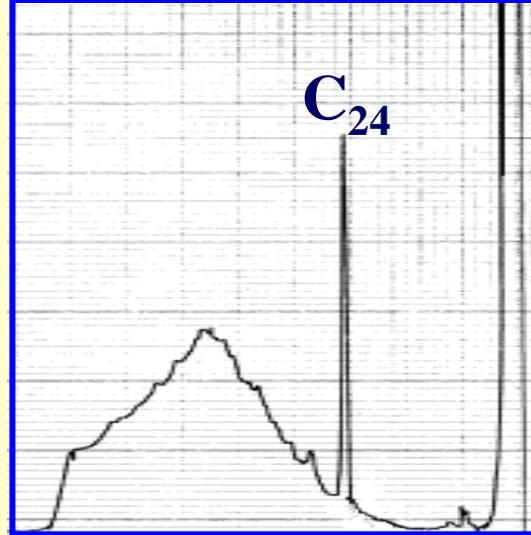
Методом хромато-масспектрометрии показано, что отобранные штаммы способны к утилизации почти всех компонентов нефти.



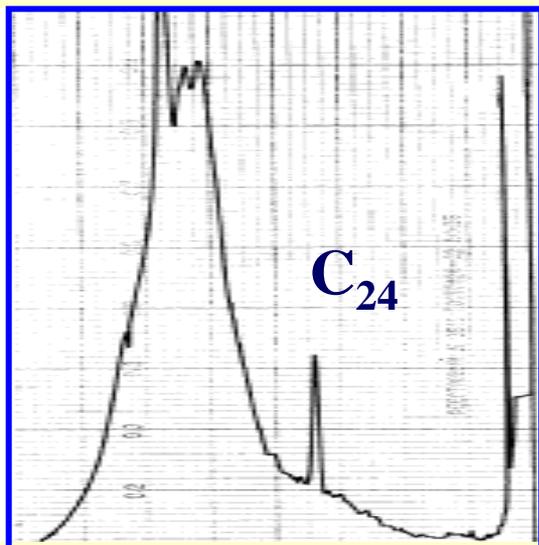
На рисунке представлен состав парафино-нафтеновых фракций исходной нефти (1) и нефти после культивирования штаммов (2).



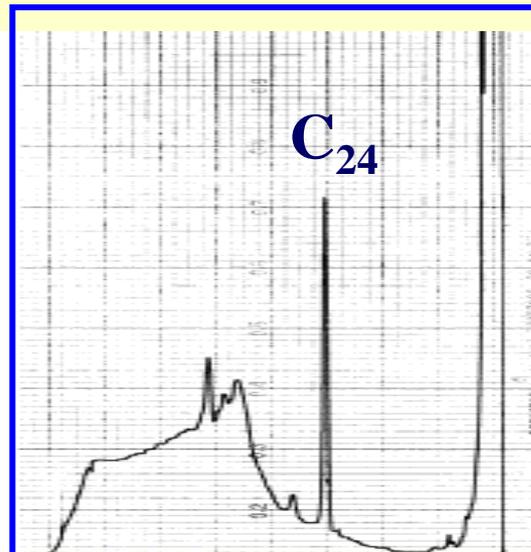
**А**



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

Известно, что усвоение углеводов 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 углеводов и /или синтез биосурфактантов, которые эмульгируют гидрофобный субстрат в ростовой среде и обеспечивают опосредованный контакт клеток с каплями углеводов.

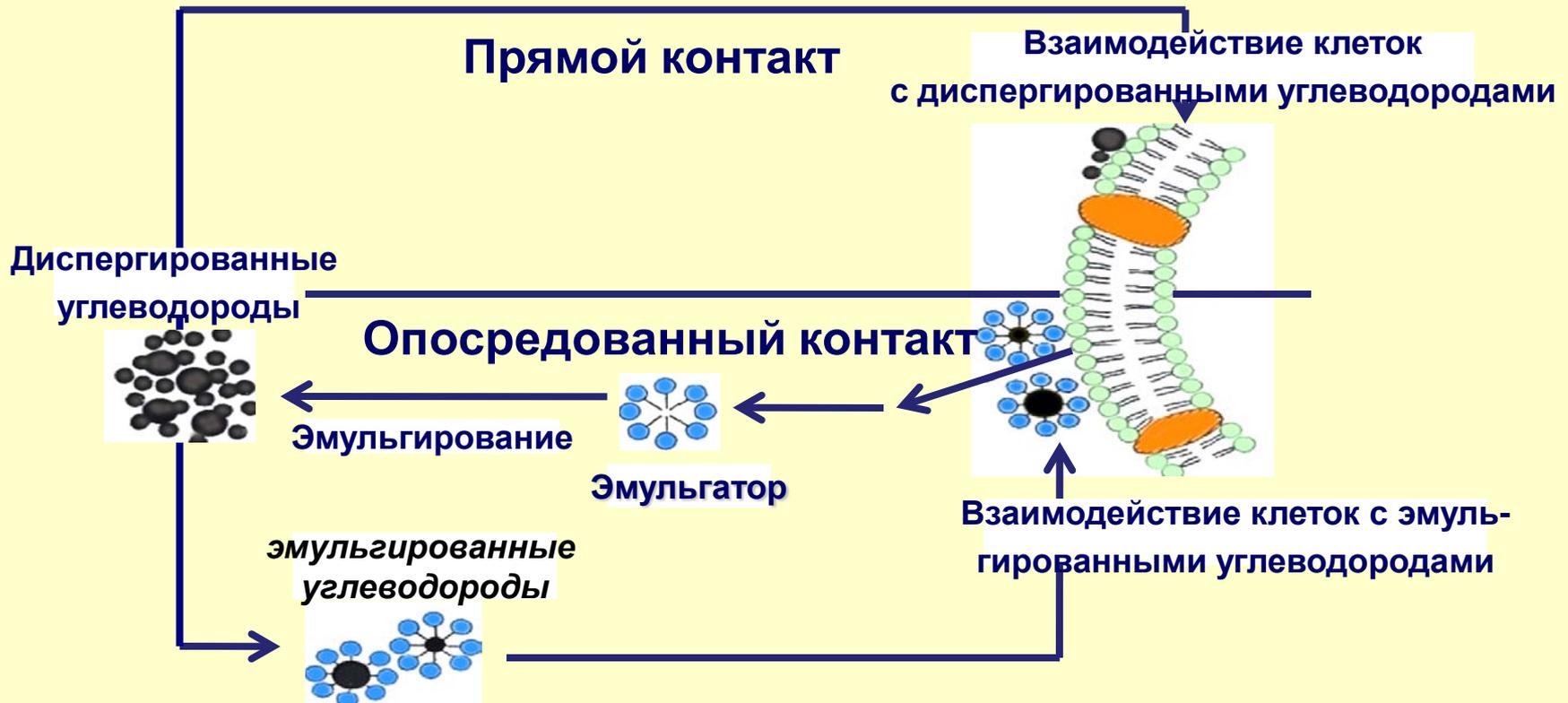
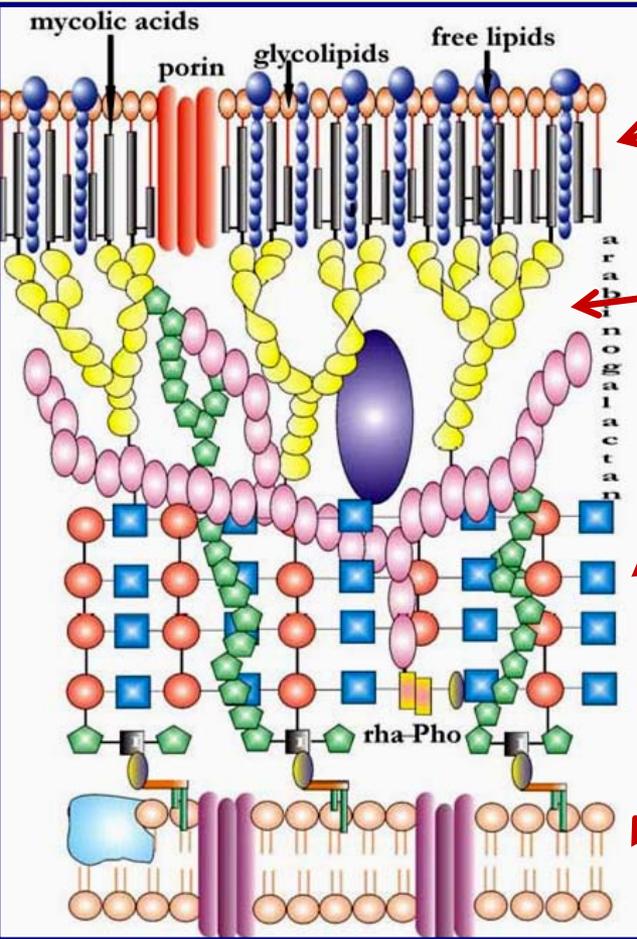


Схема взаимодействия клеток микроорганизмов с углеводами  
(цитировано по Sing, 1986)

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

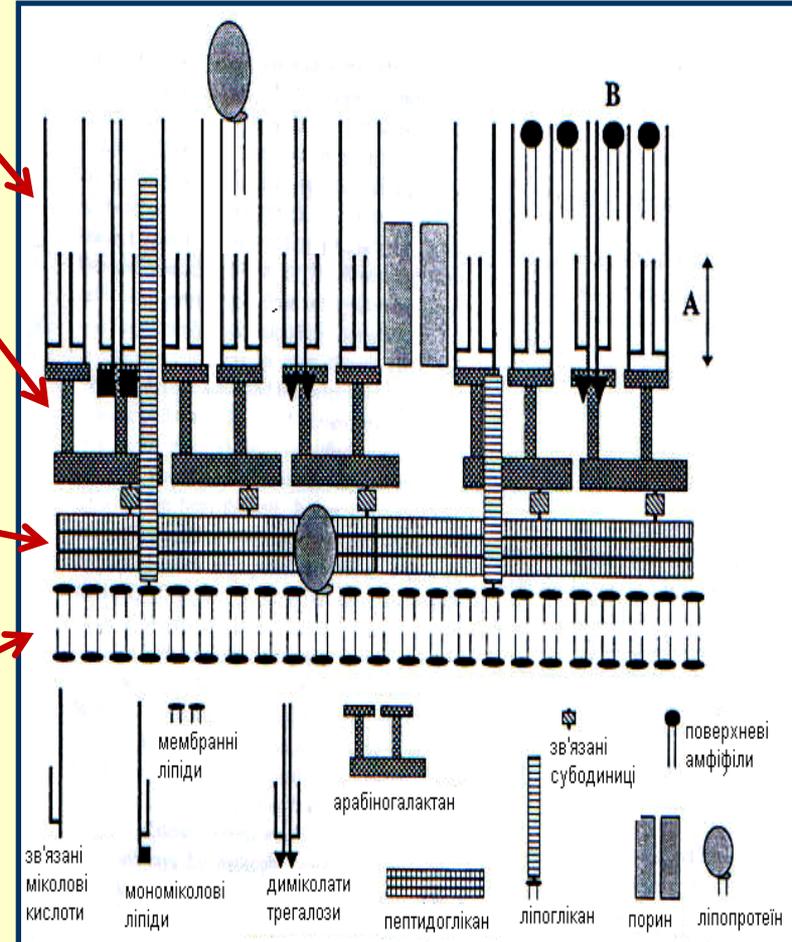


Миколовые кислоты, гликолипиды, липиды

Арабиногалактан

Пептидогликан

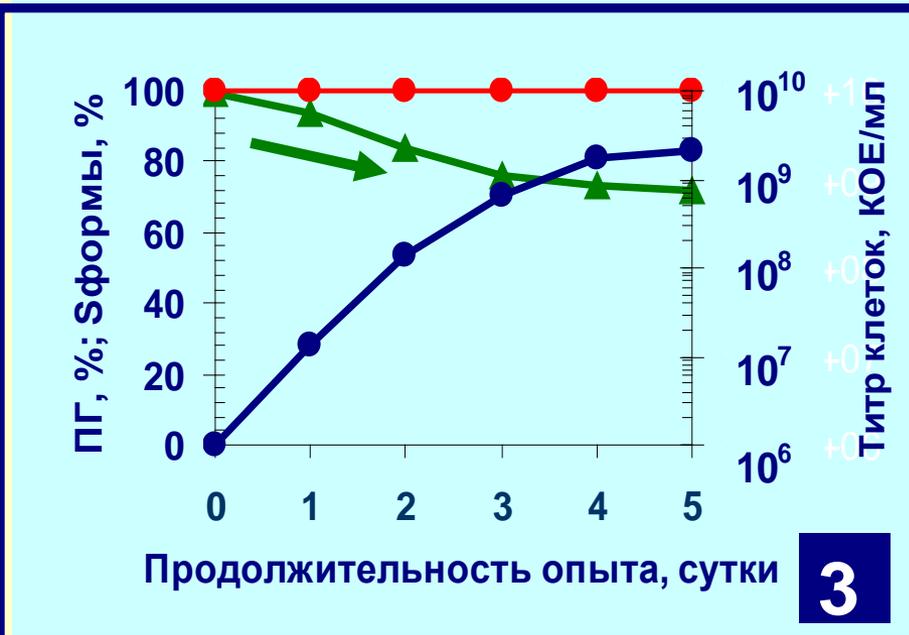
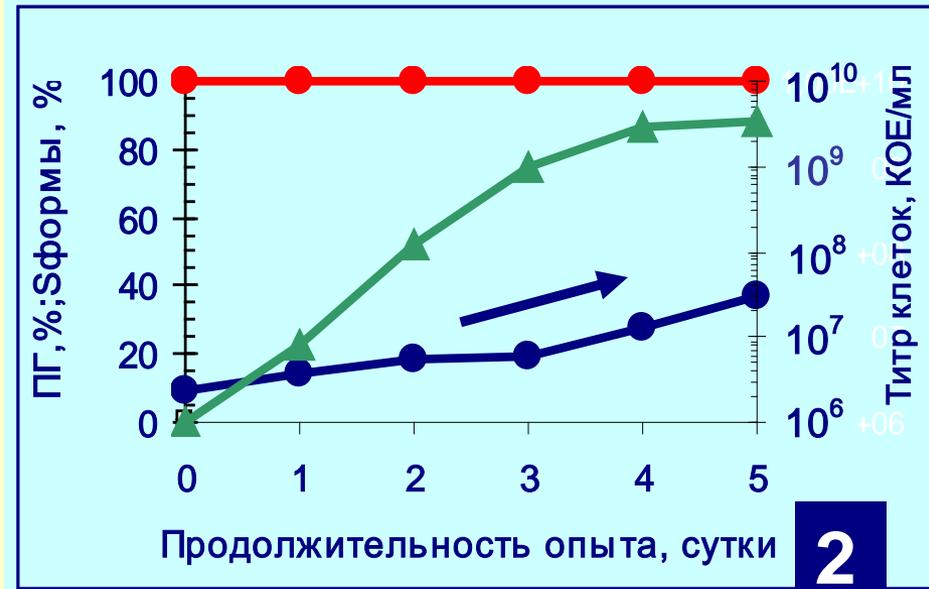
Цитоплазматическая мембрана



### Модель клеточной стенки родококков

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

# Изменение гидрофобности клеточной поверхности исследованных штаммов при росте на углеводородах

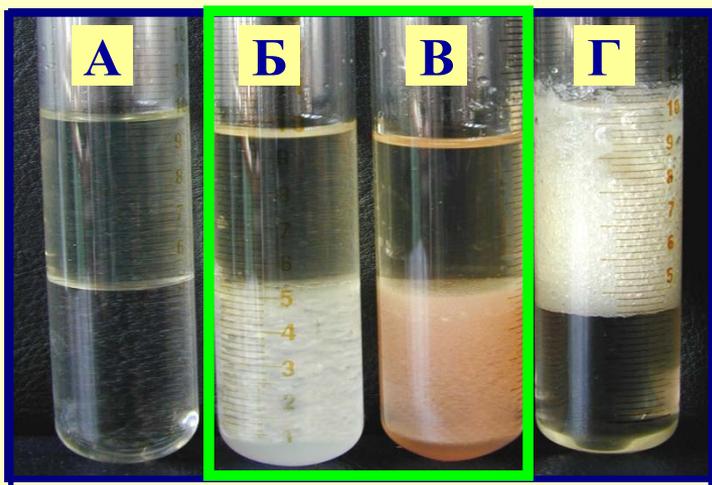


1 - *R. erythropolis*  
 2 - *G. rubripertincta*  
 3 - *A. calcoaceticus*

▲ - PG (показатель гидрофобности);  
 ● - количество S-форм;  
 ● - КОЕ (колониобразующие единицы).

# Поверхностно-активные свойства штаммов-деструкторов углеводородов нефти

Штаммы	Индекс эмульгирования (E <sub>24</sub> ), %		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 rubropertincta</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

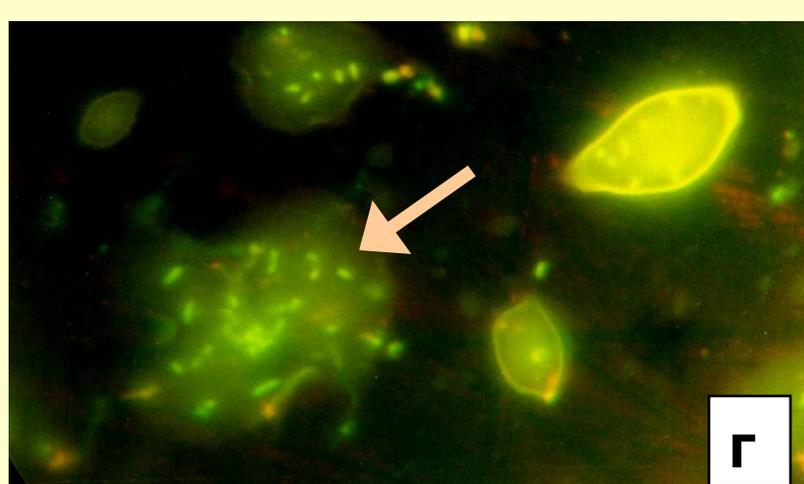
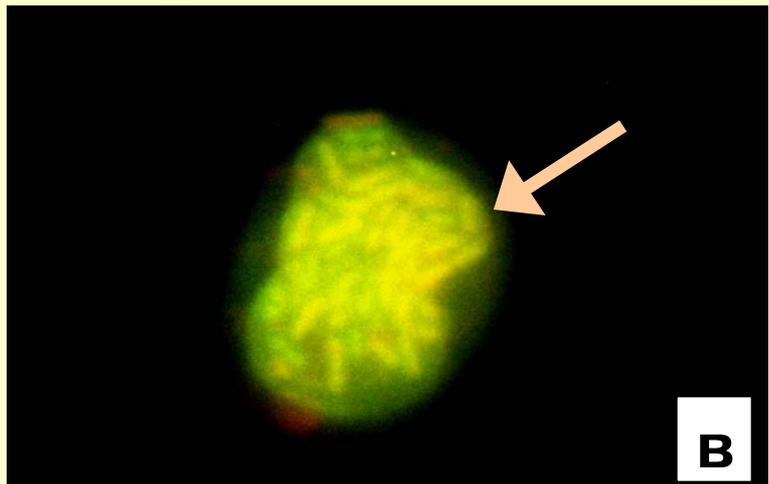
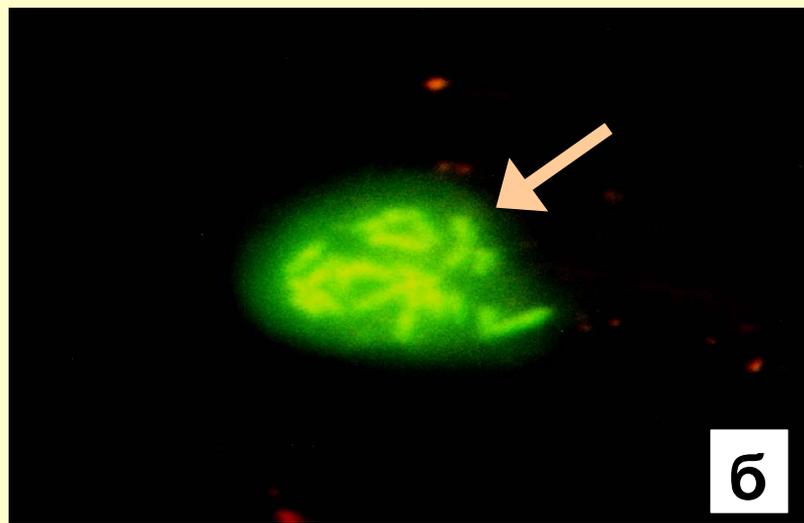
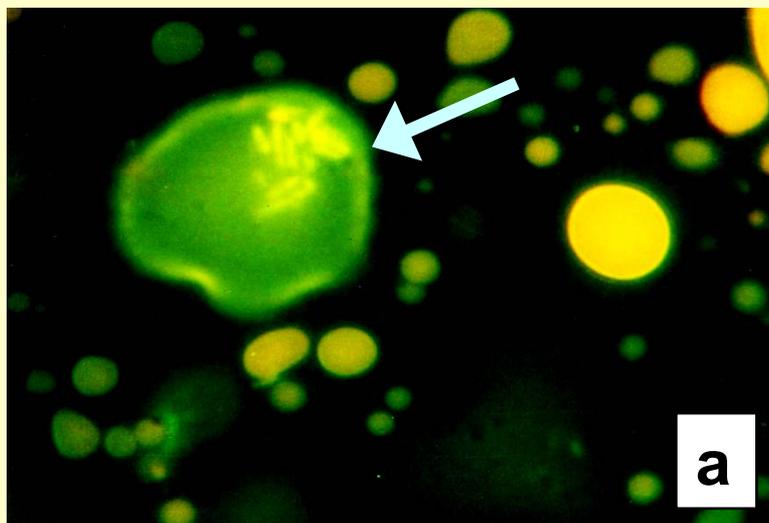
А – контрольный образец

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

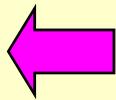


**Взаимодействие клеток родококков и гордоний  
с каплями углеводов**

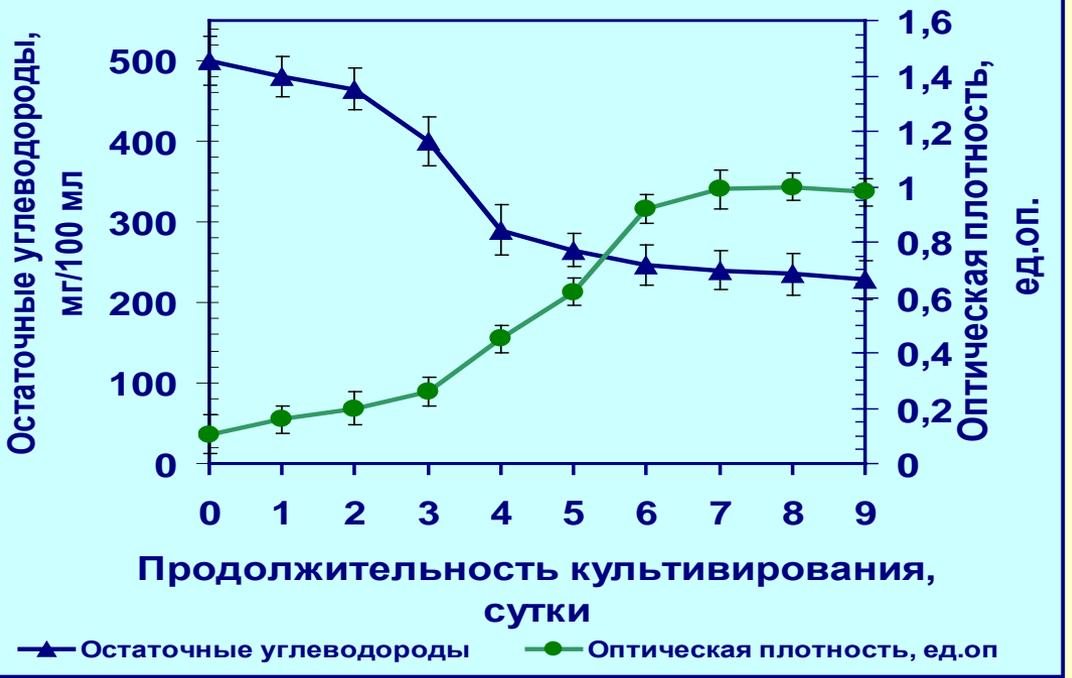
**а - проникновение и развитие клеток в капле углеводорода (1-2 сутки роста)**

**б, в - формирование микроколоний внутри капель (4-5 сутки роста)**

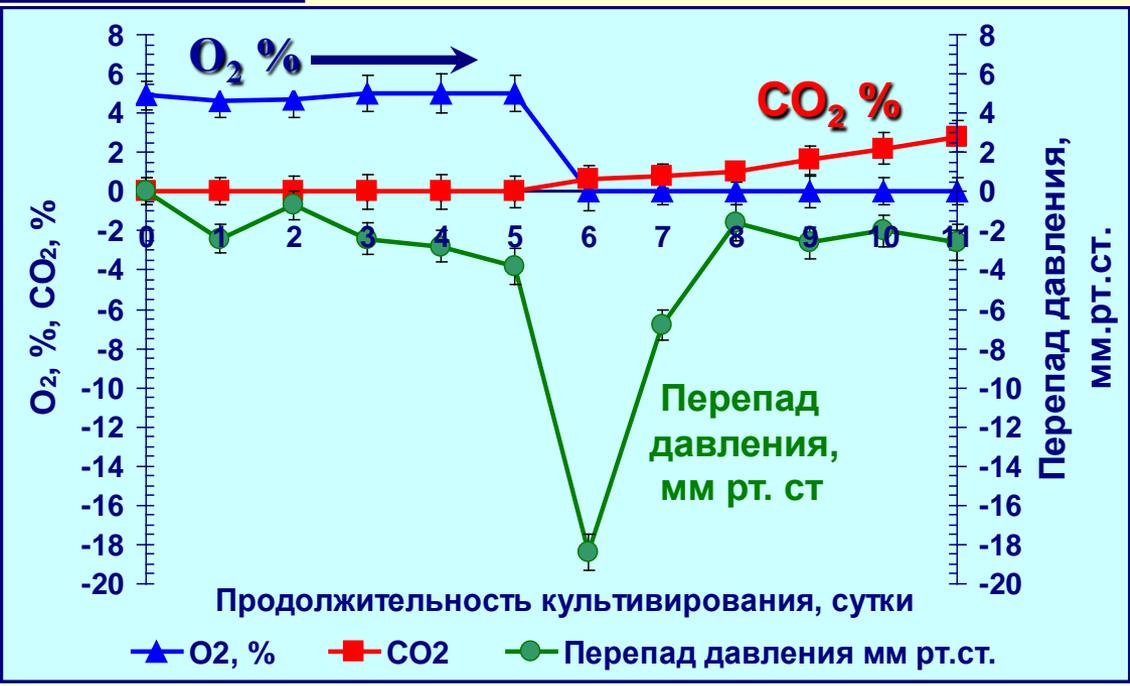
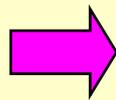
**г - разрушение капель (7 сутки).**



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 (нитроаммофоска), 2 %	

**Почва после агротехнической обработки**



**Общий вид после биоремедиации**

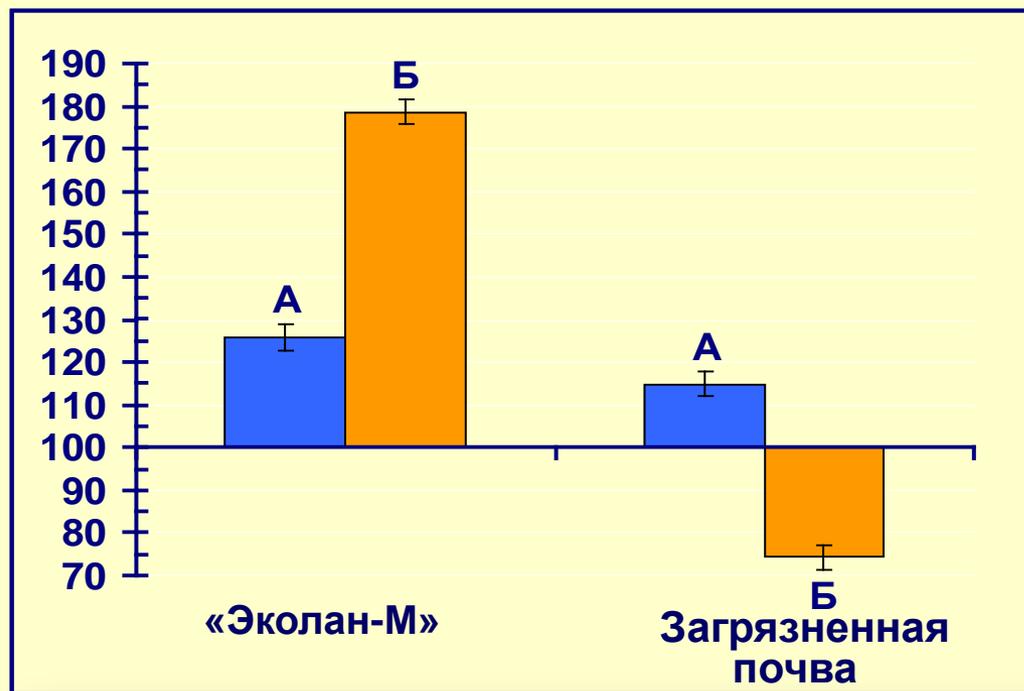


## Динамика численности гетеротрофных и углеводородокисляющих бактерий в загрязненной нефтью почве

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***

