

*На правах рукописи*

**ПАВЛИКОВА Татьяна Алексеевна**

**ДЕГРАДАЦИЯ НЕФТИ АССОЦИАЦИЕЙ  
АЭРОБНЫХ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ  
МИКРООРГАНИЗМОВ В РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ПОЧВ**

Специальность 03.00.07 — микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Москва 2004**

Работа выполнена на кафедре микробиологии Московской сельскохозяйственной академии им. К.А. Тимирязева

Научный руководитель: доктор сельскохозяйственных наук,  
профессор О.Д. Сидоренко,  
Официальные оппоненты: доктор биологических наук,  
профессор И.М. Яшин,  
кандидат биологических наук,  
И.А. Борзенков

Ведущая организация: Всероссийский Научно-исследовательский  
Институт Сельскохозяйственной Биотехнологии РАСХН

Защита состоится 23 июня 2004г. в 15<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 220.043.03 Московской сельскохозяйственной академии им. К.А. Тимирязева.

Адрес: 127550, Москва, Тимирязевская ул., д. 49.  
Ученый совет МСХА им. К.А. Тимирязева.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНБ МСХА.

Автореферат разослан «13» мая 2004 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета, профессор

 В.А. Калинин

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** В настоящее время следствием безудержного и неконтролируемого внедрения человека в природу оказывается загрязнение почвы и водоемов ксенобиотиками, несвойственными биосфере. Наиболее серьезным и трудно устранимым техногенным нарушением природы является нефтезагрязнение (Пиковский, 1988; Гузев и др., 1989; Киреева, 2001).

Значительный вклад в процесс биологического разрушения нефти вносят углеводородоокисляющие микроорганизмы, являющиеся постоянным компонентом экосистемы. В последнее время успешно разрабатываются микробиологические технологии очистки природных сред от нефтяного загрязнения, основанные на использовании ассоциаций углеводородоокисляющих микроорганизмов в сочетании с различными веществами, стимулирующими их активность (Сидоров и др., 1997; Чугунов и др., 200; Ягафарова, 2001). Важным условием микробиологической очистки загрязненных почв является способность различных групп микроорганизмов (бактерий, актиномицетов, дрожжей и микромицетов), обладая высокой интродукционной жизнеспособностью, совместно разрушать углеводороды нефти (Звягинцев, 1989; Корнелли, 2001; Якушева, 2002).

Изучение ассоциаций углеводородоокисляющих микроорганизмов и разработка методов их успешной интродукции в природные экосистемы позволят в дальнейшем развить экологическую биотехнологию в нашей стране.

Цель и задачи исследования. Основной целью нашей работы было выделение и подбор ассоциации аэробных углеводородоокисляющих микроорганизмов, активно утилизирующих углеводороды нефти, изучение их способности к биоремедиации нефтезагрязненных почв и изучение влияния сырой нефти на почвенную микробиоту.

Для решения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить, выделить и подобрать условия культивирования чистых культур микроорганизмов, способных к усвоению углеводородов нефти.
2. Отобрать штаммы микроорганизмов-деструкторов с наибольшей глубиной окисления углеводородов нефти.



3. Установить таксономическую принадлежность и физиолого-биохимические особенности микроорганизмов-деструкторов нефти.
4. Разработать комплексный микробный биопрепарат, приводящий к деградации углеводородов нефти.
5. Исследовать действие сырых нефтей разных месторождений на почвенную микрофлору и изучить особенности микробценозов загрязненных нефтью почв.

#### **Научная новизна.**

- В работе впервые выделены в чистую культуру штаммы бактерий и микромицетов, использующие углеводороды высоко- и среднепарафинистой нефти в качестве единственного источника углерода. Выделенные штаммы микроорганизмов изучены и идентифицированы до вида: *Rodococcus ruher PS02.*, *Pseudomonas putida SP-203*, *Trichodermm citrinoviride VS-89*, *Metairhizium anisopliae AF-78*, *Aspergillus cameus SU-TM-03*.

- Установлено, что ассоциация аэробных углеводородоокисляющих микроорганизмов обладает высокой интродуктивной жизнеспособностью в нефтезагрязненных почвах. Они высоко активны в деструкции сырой нефти и ее легких фракций (н-алканов) при относительно-низких температурах (8-15°C).

- Впервые изучены микробценозы нефтезагрязненных почв модифицированным методом прямого микроскопирования.

- Выявлена роль углеводородоокисляющих штаммов микроорганизмов в деградации нефти в почвах и аллювиальном песке речной террасы.

**Практическая ценность работы.** На основе созданной ассоциации выделенных штаммов-деструкторов углеводородов нефти разработан комплексный биопрепарат, показавший высокую активность в окислении сырой нефти Сугмутского и Харьягинского месторождений. Препарат позволяет в течение 4 месяцев снизить токсичность почвы, загрязненной сырой нефтью, до уровня, не препятствующего росту растений. Результаты исследований могут служить основой для разработки технологии получения биопрепаратов для очистки почв и

водоемов, загрязненных сырой нефтью в широком температурном диапазоне ( $t=15-28^{\circ}\text{C}$ )

**Апробация работы.** Основные положения и результаты исследований представлены и одобрены на 36-ой Международной научной конференции «Агрехимические аспекты повышения продуктивности сельскохозяйственных культур» (Москва, 2002); на Всероссийской научно-технической конференции с международным участием «Высокоэффективные технологии, методы и способы для их реализации» (Москва, 2003); на заседании кафедры микробиологии МСХА им. К.А. Тимирязева (25 марта 2004 г).

**Публикации.** Основное содержание диссертации изложено в 4 опубликованных работах, оформляется патент Российской Федерации.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа изложена на 110 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, методической части, результатов исследований, выводов и списка литературы. Экспериментальный материал приведен в 19 таблицах и 30 рисунках. Список литературы включает 130 наименований, в том числе 26 иностранных.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Объекты и методы исследования

Основными объектами исследований служили чистые культуры углеводородокисляющих микроорганизмов, выделенные в ходе эксперимента: *Pseudomonas putida* SP-203 (выделенный из нефтезагрязненной черноземной почвы), *Rhodococcus ruber* PS-02 (выделенный из нефтезагрязненной дерново-подзолистой почвы), *Trichoderma citrinoviride* VS-89 (выделенный из компоста), *Metarrhizium anisopliae* AF-78 (выделенный из красновато-бурой почвы), *Aspergillus carneus* SU-TM-03 (выделенный из сырой нефти Сугмутского месторождения).

Материалом исследования являлись образцы почв: 1) дерново-подзолистая среднесуглистая почва (лесная опытная дача МСХА). 2) типичный

чернозем тяжелосуглинистый (Липецкая область). 3) аллювиальный песок речной террасы (пойма реки Волга). В работе дополнительно использовали красновато-бурую почву сухих саванн; компост высокого нагрева, запатентованный как органический почвогрунт (Сидоренко, патент РФ № 2110170).

Экспериментальное загрязнение почв проводили нефтью двух типов, полученных в НИИ газа и нефти им. Крылова (г. Москва):

-Нефть-А: нефть Харьягинского месторождения характеризуется как высокопарафинистая, сернистая, температура застывания нефти +29°C.

-Нефть-Б: нефть Сугмутского месторождения среднепарафинистая, сернистая, температура застывания нефти +10°C.

Для изучения углеводородокисляющей активности микроорганизмы культивировали на жидкой минеральной среде Раймонда (Raymond, 1961) с 1% NaCl и сырой нефтью, легкими фракциями нефти (керосин, соляровое масло), тяжелой фракцией (мазут), а также ароматической фракцией (толуол) (0,5 - 10%) (температура инкубирования 26-28°C).

Идентификацию полученных культур микроорганизмов проводили по культуральным, морфологическим и биохимическим признакам, используя определители бактерий Берджи, 1997; Вейант и др., 1999; Смирнов, 1990; определители грибов Domsch, Grams., Anderson, 1980; Саттон, Фотергилл, 2001; Билай и др., 1988; а также определитель грибов рода *Trichoderma* Samuel's, Petini, Kuhes, 2000.

Культивирование проводили при разных температурных режимах: при 37°C, 28°C, 16°C и при 8°C, а также при разной аэрации: в стационарной культуре и на качалке (при 100 об/мин).

Изменение химического состава нефти и трансформацию углеводов в процессе микробиологического воздействия изучали методом газовой хроматографии. Экстракцию углеводов проводили по методу, принятому в лаборатории нефтяной микробиологии Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, в собственной модификации. Анализу подвергали растворенную гексаном алифатическую фракцию нефти, анализировали на содержание в

нем различных групп углеводов. Газохроматографический анализ углеводородного состава нефти проводили на хроматографе НР- 5890 серии 2 с использованием пламенно-ионизационного детектора. Условия проведения анализа: газ-носитель - гелий, скорость гелия через колонку-2 мл/мин, начальная температура - 100°С, конечная - 320°С.

Активность биопрепарата, созданного нами на основе выделенных углеводородоокисляющих штаммов, проверяли в стеклянных сосудах с массой почвы 300г.

Схема опыта:

№	Образцы почв	Нефть (300 мг/кг)	Компост (3% от веса почвы)	Биопрепарат (100 мг/кг)
1 1	Дерново-подзолистая почва	-	-	-
1 2	Черноземная почва	-	-	-
1 3	Аллювиальный песок	-	-	-
2 1	Дерново-подзолистая почва	-	+	-
2 2	Черноземная почва	-	+	-
2 3	Аллювиальный песок	-	+	-
3 1	Дерново-подзолистая почва	Нефть А	-	-
3 2	Черноземная почва	Нефть А	-	-
3 3	Аллювиальный песок	Нефть А	-	-
3 4	Дерново-подзолистая почва	Нефть Б	-	-
3 5	Черноземная почва	Нефть Б	-	-
3 6	Аллювиальный песок	Нефть Б	-	-
4 1	Дерново-подзолистая почва	Нефть А	+	-
4 2	Черноземная почва	Нефть А	+	-
4 3	Аллювиальный песок	Нефть А	+	-
4 4	Дерново-подзолистая почва	Нефть Б	+	-
4 5	Черноземная почва	Нефть Б	+	-
4 6	Аллювиальный песок	Нефть Б	+	-
5 1	Дерново-подзолистая почва	Нефть А	-	+
5 2	Черноземная почва	Нефть А	-	+
5 3	Аллювиальный песок	Нефть А	-	+
5 4	Дерново-подзолистая почва	Нефть Б	-	+
5 5	Черноземная почва	Нефть Б	-	+
5 6	Аллювиальный песок	Нефть Б	-	+

Примечание: - Нефть - А: нефть Харьгинского месторождения  
- Нефть - Б: нефть Сугмутского месторождения

Согласно схеме опыта в верхние слои почвы вносили нефти в массе 300мг/кг от веса почвы, 3 % компоста и биопрепарат ( $\text{Титр} = 10^{10} \text{КОЕ/г}$  препарата) на основе ассоциации углеводородоокисляющих микроорганизмов в коли-

честве 100мг/кг. Угледородоокисляющую микрофлору активировали внесением растворов минеральных солей.

Изучали влияние нефтяного загрязнения на динамику микрофлоры. Учитывали численность мезофильных гетеротрофных микроорганизмов, численность микромицетов и угледородоокисляющих микроорганизмов.

Исследования ценозов микроорганизмов нефтезагрязненных почв проводили прямым методом учета, предложенным Н.Г. Холодным (стекла обростания) в нашей модификации: препараты окрашивали по Граму. При микроскопировании препаратов изучали структуру микробного ценоза, плотность обростания и распределение микроорганизмов. Учитывали доминирующие формы, проводили микрофотосъемки.

Анализ остаточного содержания нефти в почве осуществляли методом извлечения суммы неполярных и малополярных угледородов органическим растворителем - четыреххлористым углеродом ( $CCl_4$ ) (Семенов и др., 1976; Эрнестова, 1979). Изменяли интенсивность поглощения каждого раствора на инфракрасном спектрометре модели "Jasco JR - S" (Япония) в интервале длин волн 2800-3200  $см^{-1}$ . Одну кювету (из кристаллов NaCl) заполняли  $CCl_4$ , предварительно пропущенного через колонку с окисью алюминия (кювета сравнения), другую — исследуемым раствором. Содержание нефти рассчитывали методом базисной линии. Последнюю проводили как касательную к основанию двух пиков, соответствующих симметричным и асимметричным валентным колебаниям  $-CH_2-$  и  $-CH_3-$  групп. Анализ вели по полосе асимметричных валентных колебаний метиленовых групп ( $2926см^{-1}$ ).

Биологический тест на остаточную токсичность почвы определяли по прорастанию семян тест - растений: кресс-салата (*Lepidium sativum*) и пшеницы сорта "Московская — 35" (*Triticum durum*). В сосуды вносили семена тест растений. Фиксировали процент проросших семян и длину проростков. Пороговым считали промежуток времени, при котором прорастает лишь 70% ( $LD_{70}$ ) семян тест-растения. По всхожести семян и скорости роста тест - растений су-



дили об остаточной токсичности почвы в сравнении с контролем (интактная и нефтезагрязненная почва без биопрепарата).

Повторность опытов трехкратная. Результаты экспериментов обрабатывались методами математической статистики и выражались в виде графиков и таблиц с помощью пакета программ «Microsoft Excel». Обработку данных проводили с помощью программы "Stars", считали достоверный порог значимости полученных значений при  $P \geq 0,05$  (критерий Стьюдента). Текстолого-редакционную работу выполняли с помощью пакета "Microsoft Word 2000".

## **Результаты исследований и их обсуждение**

### Выделение и отбор штаммов микроорганизмов, активно усваивающих углеводороды нефти

Методом накопительных культур из различных субстратов (искусственно загрязненные нефтью дерново-подзолистая и черноземная почвы; красновато-бурая почва; аллювиальный песок; компост высокого нагрева и образцы нефти Сугмутского и Харьягинского месторождений) на минеральной среде Раймонда с нефтью и 1% NaCl выделены 30 наиболее активных штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов. При отборе использовали следующие показатели: помутнение среды (водной фазы), появление пигментов, образование осадка, эмульгирование и распад нефти, а также снижение pH культуральной жидкости.

При первичном скрининге общего числа выделенных углеводородокисляющих микроорганизмов оставлены 13. Газохроматографический анализ показал их высокую активность в деструкции насыщенной фракции углеводородов (табл. 1). Для дальнейших исследований методом селективного аналитического отбора и по данным газохроматографического анализа нами оставлены наиболее активные штаммы микроорганизмов. Критериями отбора активных деструкторов служили такие показатели, как избирательное удаление нормальных n-алканов в насыщенной фракции нефти и снижение соотношения коэффициента труднодоступных соединений нефти пристан/фитан (табл. 1).

Определена таксономическая принадлежность активных штаммов микро-

организмов. В автореферате дана их краткая характеристика:

- Культуры с зеленовато-синей пигментацией, грамтрицательные, клетки палочковидные, вегетативные клетки подвижны; спор не обнаружено. Колонии вызывают посинение сред-*Pseudomonas putida* (Смирнов, 1981; Берджи, 1997; Вейант и др., 1999).

- Культуры с розовой или кремовой пигментацией, грамположительные, аэробы, с палочковидными или нитевидными, часто ветвящимися клетками (8-10-12 мкм), складывающимися в характерные V-формы. Воздушный мицелий отсутствует - *Rhodococcus ruber* (Берджи, 1997).

- Гифы септированные, бесцветные, многократно супротивно разветвленные конидиеносцы, фиалиды вздутые у основания, расположенные на конидиеносце в большинстве под углом 90° и несущие шаровидные конидии, собранные в головки, каждая из которых состоит из 10-20 одноклеточных бесцветных конидий. Колонии зеленого цвета с участками рыхлой войлочной поверхности - *Trichoderma citrinoviride* (Domsch et al, 1980; Gary Samuel's, 2000).

- Гифы септированные, бесцветные, фиалоконидии удлиненные, одноклеточные, почти бесцветные, эллипсоидные, размером 6-9 x 2,5-4,5 мкм. Конидии сгруппированы в цепочки и колонки, в массе дают зеленую окраску. Колонии белые, цилиндрические, диаметром 5-6 мм. С возрастом их диаметр увеличивается до 15-20 мм и они становятся серыми - *Metarrhizium anisopliae* (Domsch et al, 1980; Саттон и др, 2001).

- Гифы септированные, бесцветные. Конидиеносцы 250-400 мкм в высоте, изогнутые, бесцветные. Апикальное расширение вздутий полушаровидное, практически полностью покрытое фиалидами. Стеригмы двухъярусные, располагаются рыхло в 2 яруса. Конидии шаровидные 2,5-3,5 мкм. Колонии дымчатые, серовато-зеленые, быстрорастущие. По фактуре колонии шерстистые - *Aspergillus carneus* (Domsch et al, 1980; Билай, 1988).

Выделенные активные штаммы углеводородокисляющих микроорганизмов депонированы в коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии Московской сельскохозяйственной академии им. К.А. Тимирязева под кодом *Asp.carneusSU-TM-03*, *Met.anisopliaeAF-78*, *TrickcitrinovirideVS-89*, *Rh.ruberPS-02*, *PsputidaSP-203*.

Таблица 1. Изменение состава насыщенных фракций углеводородов нефти в процессе микробной деградации.  
Результаты газохроматографического анализа

<i>Исследуемый микроорганизм</i>	<i>пристан/ фитан</i>	<i>пристан/ нС17</i>	<i>фитан/ нС18</i>	<i>% н-алканов в насыщ. фракции</i>	<i>% ацикл.изопрен. в насыщ. фракции</i>	<i>ациклич. изопрен./ н-алканы</i>
контроль (нефть А)	1,14	0,76	0,76	44,1	11,05	0,25
Bacillus spp.	1,05	1,16	1,71	35,51	12,56	0,35
Candida spp.	1,06	1,89	1,68	32,25	14,21	0,44
Arthrobacter spp.	1,01	1,02	1,35	35,55	13,32	0,37
Rhodococcus spp	0,85	2,54	1,91	18,56	19,97	1,07
Aspergillus spp.	0,98	1,98	1,51	29,13	15,62	0,56
Trihoderna spp.	0,99	2,01	1,52	20,18	15,5	0,76
Pseud. aeruginosa	1,05	1,16	1,01	29,9	12,2	0,4
Micrococcus spp.	1,08	1,15	1,14	28,9	13,8	0,47
Fusarium spp.	1,03	1,08	1,86	30,2	12,5	0,41
Mhetarisiium spp	0,88	2,98	3,49	18,33	19,9	1,08
Pseudomonas putida	0,96	2,47	2,88	20,15	16,88	0,83
Nocardia spp.	1,09	1,05	1,98	35,8	10,01	0,27

### Рост выделенных углеводородокисляющих микроорганизмов

Характер роста микроорганизмов обусловлен видом микроорганизма, условиями культивирования и особенностями углеводорода (Корнелли и др, 2001)

**Таблица 2. Рост выделенных углеводородокисляющих микроорганизмов при разных температурных режимах.**

№	Температура	8°C	16°C	28°C	37°C
	Штамм				
1	<i>Pseudomonas putida</i> SP-203	8-5	8-5	10	8-5
2	<i>Rhodococcus ruber</i> PS-02	8-5	10	10	4-3
3	<i>Trichoderma citrinoviride</i> VS-89	4-3	8-5	10	4-3
4	<i>Aspergillus carneus</i> SU-TM-02	4-3	10	8-6	1-2
5	<i>Metarrhiziumanisophae</i> AF-03	1-2	4-3	10	4-3

Примечание *рост бактерий и микромицетов оценивши в условных единицах (баллы)* (Хомякова, 2003) *За 10баллов принимали активный быстрый рост с максимальным накоплением биомассы, в 8-5баллов оценивали средний рост, в 4-3 - слабый рост, в 1-2 - очень слабый и медленный рост 0баллов - отсутствия за 20дней культивирования*

Нами установлена психроактивность выделенных штаммов и способность нормально расти при температуре от 8°C до 16°C (табл. 2) Бактериальные штаммы *Rh. ruber PS-02* и *Ps. putida SP-203* способны к активному росту и использованию нефти при пониженной температуре 8°C. Микромицеты относятся к мезофильным микроорганизмам. Оптимальная температура для развития микромицета *Asp carneus SU-TM-02* - 16°C.

В настоящее время доказано, что углеводородокисляющие бактерии способны окислять углеводороды нефти как в присутствии, так и в отсутствии кислорода. Однако, основная роль принадлежит аэробному процессу биодegradации (Самосова и др, 1982).

**Таблица 3. Влияние аэрации на рост углеводородокисляющих микроорганизмов**

№	Температура Штамм	16°C		28°C	
		Отсутствует	100 об/мин	Отсутствует	100 об/мин
1	<i>Ps. putida SP-203</i>	8-5	10	8-5	10
2	<i>Rh. ruber PS-02</i>	8-5	10	10	10
3	<i>Trich.citrinoviride VS-89</i>	4-3	2-1	8-5	4-3
4	<i>Asp. carneus SU-TM-02</i>	8-5	4-3	4-3	2-1
5	<i>Met. anisopliae AF-03</i>	4-3	2-1	10	4-3

Примечание: рост микроорганизмов оценивали в условных единицах (баллы) (Хомякова, 2003).

Рост бактерий *Ps. putida SP-203* и *Rh. ruber PS-02* при аэрации заметно возрастает (как при 16°C, так и при 28°C) (таб. 3). Обратной противоположной тенденцией роста и развития при аэрации наблюдается у углеводородокисляющих микромицетов: *Trich. alrinoviride VS-89*, *Asp. carneus SU-TM-02* и *Met. anisopliae AF-03*. Стационарные условия роста являются наиболее оптимальными для их развития.

Таким образом, все выделенные нами штаммы углеводородокисляющих микроорганизмов являются строгими аэробами с оптимальной температурой развития в 28°C.

#### Химическая трансформация углеводородов нефти выделенными микроорганизмами

Нефть - сложная смесь алканов (парафиновых и ациклических насыщенных углеводородов), нафтенных и ароматических углеводородов различной молекулярной массы. Дополняют их кислородные, сернистые и азотистые производные углеводородов (Петров, 1984). В настоящее время известно, что окислению могут быть подвергнуты практически любые углеводороды, причём скорость их деградации прямо зависит от вида микроорганизма (Киреева, 1995; Корнелли, 2003).

Результаты проведенных нами газохроматографических исследований

выявили, что ассоциация микроорганизмов (*Ps. putida SP - 203*, *Rh. ruber PS-02*, *Trick citrinoviride VS-89*, *Asp. carneus SU-TM-02* и *Met. anisopliae AF-03*) при росте в жидкой среде Раймонда с 5% нефти Харьягинского месторождения и 1% NaCl ( $t=26-28^{\circ}\text{C}$ ) в течение 10 дней разлагает более 50% углеводородов нефти.

На 5 сутки отмечается снижение содержания нефти на 18-25%. Происходит избирательное удаление н-алканов состава  $\text{C}_{12} - \text{C}_{30}$  (с 44,1% до 26,3%), снижается соотношение коэффициента труднодоступных соединений нефти пристан/фитан с 1,14 до 1,02.

На 10 сутки отмечается снижение содержания углеводородов нефти более чем на 50%. Суммарная концентрация нормальных алканов состава  $\text{C}_{12} - \text{C}_{30}$  уменьшается с 44,1% до 13,3%.

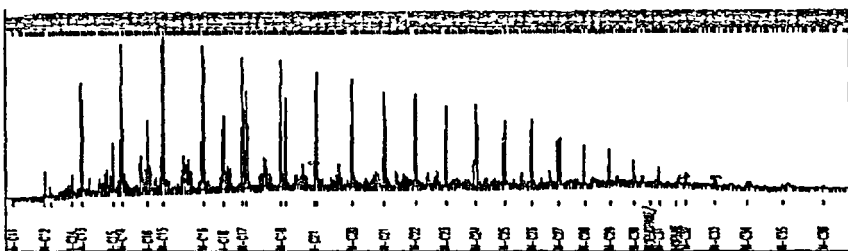


Рис.1 Хроматограмма насыщенной фракции контрольного образца нефти Харьягинского месторождения.

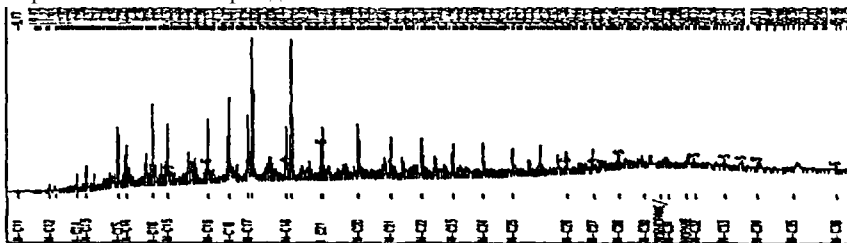


Рис. 2 Окисление углеводородов нефти ассоциацией микроорганизмов. Хроматограмма насыщенной фракции нефти Харьягинского месторождения после 10-дневной инкубации ассоциацией аэробных углеводородоокисляющих микроорганизмов.

Увеличивается значение изопреноидного коэффициента с 11,05 до 18,7. Это свидетельствует о первом этапе окисления, когда происходит избиратель-

ное удаление легкодоступных n-алканов из насыщенной фракции нефти. В ходе окисления углеводородов снижается коэффициент пристан/фитан (с 1,14 до 0,69), меняется нефтяной паспорт и общий химический тип нефти ( $A^1 \rightarrow A^2$ ), что, предположительно, может рассматриваться в качестве основного геохимического процесса, приводящего к эволюции нефтей и определяющего, таким образом, большое разнообразие их состава в природе (Петров, 1984).

Таким образом, результаты изучения трансформации нефти выявили, что ассоциация микроорганизмов (*Ps. putida* SP - 203, *Rh. ruber* PS- 02, *Trick citrinoviride* VS - 89, *Asp. carneus* SU- TM- 02 и *Met. anisopliae* AF - 03) обладает высокой активностью в деструкции сырой нефти и ее легких фракций (n-алканов).

#### Особенности интродукции углеводородоксиляющих микроорганизмов в компост и почву

Эффективность биологической очистки напрямую зависит от соблюдения и выполнения всех тонкостей процесса интродукции микроорганизмов в субстрат и далее в нефтезагрязненные системы (Гузев, Звягинцев, 1998).

Углеводородоксиляющие микроорганизмы, составляющие основу разработанного нами биопрепарата, обладают высокой жизнеспособностью при внесении их в почву. Титр бактериальных клеток при инокуляции в компост составляет  $1 \times 10^{12}$  КОЕ/г, спор микромицетов -  $1 \times 10^8$  КОЕ/г. По истечении 5, а далее 10 суток наблюдается постепенное снижение количества интродуцированных микроорганизмов, что можно объяснить временной адаптацией внесенных в субстрат штаммов. Данная тенденция снижения численности интродуцированных микроорганизмов стабилизируется лишь к 30 суткам и составляет в среднем от  $1 \times 10^6$  до  $3,5 \times 10^{11}$  КОЕ/г. Также выявлено отсутствие *Asp. carneus* SU - TM- 02 в субстрате на 30 сутки.

Численность подавляющего большинства микроорганизмов после внесения их в нефтезагрязненную почву стабилизируется на определенном уровне. В редких случаях популяция гибнет. Как правило, гибель отмечается у микроор-

ганизмов, которые не могут переносить низких значений рН. Они отличаются большой интенсивностью обмена и требуют непрерывного притока питательных веществ (Киреева и др., 1997).

Таблица 4: Численность углеводородокисляющих микроорганизмов в компосте

№	Штаммы	Титр инокулированных в субстрат микроорганизмов (КОЕ/г субстрата)			
		<i>В день инокуляции</i>	<i>Через 5 суток</i>	<i>Через 10 суток</i>	<i>Через 30 суток</i>
1.	<i>Ps. putida SP – 203</i> (n=9)	$1,1 \times 10^{12} \pm 9,8$	$1,8 \times 10^{11} \pm 8,8^*$	$2,2 \times 10^{10} \pm 7,8$	$1,7 \times 10^{10} \pm 8,9$
2.	<i>Rh. Ruber PS – 02</i> (n=9)	$1,4 \times 10^{12} \pm 10,1$	$3,5 \times 10^{11} \pm 10,0^*$	$2,8 \times 10^{11} \pm 10,5^*$	$1,8 \times 10^{11} \pm 11,0$
3.	<i>Met. Anisopliae AF-78</i> (n=9)	$1,1 \times 10^8 \pm 10,0$	$4,1 \times 10^7 \pm 9,1^*$	$5,2 \times 10^6 \pm 10,1^*$	$1,8 \times 10^6 \pm 5,5^*$
4.	<i>Trich. citrinoviride VS – 89</i> (n=9)	$1,4 \times 10^8 \pm 7,5$	$8,9 \times 10^7 \pm 8,1^*$	$6,8 \times 10^7 \pm 9,7^*$	$4,9 \times 10^7 \pm 10,0$
5.	<i>Asp. carneus SU – TM – 03</i> (n=9)	$1,2 \times 10^8 \pm 7,5$	$1,1 \times 10^7 \pm 6,5^*$	$0,5 \times 10^6 \pm 5,7^*$	$0 \times 0^0$
6.	<i>Ps. putida SP – 203 + Rh. ruber PS – 02</i> (n=9)	$1,2 \times 10^{12} \pm 7,5$	$9,8 \times 10^{11} \pm 7,7^*$	$7,8 \times 10^{11} \pm 5,8$	$3,5 \times 10^{11} \pm 10,3^*$
7.	<i>Met. anisopliae AF – 78 + Trich. citrinoviride VS – 89 + Asp. carneus SU – TM – 03</i> (n=9)	$1,2 \times 10^8 \pm 8,5$	$4,2 \times 10^7 \pm 10,0^*$	$2,1 \times 10^6 \pm 8,5^*$	$1 \times 10^6 \pm 9,6$
8.	Все штаммы вместе (n=9)	$1,2 \times 10^{10} \pm 7,2$	$9,5 \times 10^9 \pm 11,3^*$	$8,0 \times 10^9 \pm 7,8$	$6,6 \times 10^9 \pm 10,2$

Примечание: п - количество значений в выборке;  $M \pm m$  - средняя арифметическая и её ошибка; \* - достоверная разница ( $p \geq 0,5$ ) при сравнении показателей во времени (5→10→30 дней)

Выживаемость микроорганизмов изучена путем внесения соответствующих штаммов с компостом в различные типы нефтезагрязненных почв. Активная приспособляемость определена у бактериальных штаммов, менее активная - у микромицетов. Высокой жизнеспособностью обладает ассоциация *Ps. putida SP-203* и *Rh. ruber PS -02*. Данная ассоциация сохраняет высокую численность даже по истечении 4 месяцев эксперимента. Наиболее благоприятные условия для развития интродуцированных микроорганизмов и наибольшая чис-



ленность выявлены в нефтезагрязненной черноземной почве. Наибольший процент интродуцированных микроорганизмов отмечен в почвах, загрязненных нефтью Сугмутского месторождения. Установлено отсутствие *Asp. carneus SU-TM-03*.

Таким образом, выявлена высокая жизнеспособность углеводородокисляющих микроорганизмов (за исключением штамма *Asp. carneus SU-TM-03*) при интродукции их в компост и нефтезагрязненные почвы.

#### Конструирование микробного консорциума для биопрепарата, разрушающего нефть

Одним из главных способов интенсификации микробного разложения углеводов нефти является внесение различных биопрепаратов, содержащих биомассу специально подобранных штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов. В России наиболее известными биопрепаратами на основе углеводородокисляющих микроорганизмов является «Путидойл (Евдокимова и др., 1994), «Псевдомин» (Емцев, Станкевич, 2002), «Экойл» (Ермоленко и др., 1994), «Деворойл» (Сидоров, Борзенков и др., 1997) и т.д. Однако, в литературе практически отсутствуют упоминания о применении штаммов микромицетов как одних из наиболее перспективных деструкторов нефти.

Для усовершенствования биотехнологических методов рекультивации нефтезагрязненных почв нами был сконструирован биопрепарат на основе штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов *Ps. putida SP-203*, *Rh ruber PS-02*, *Trick citrinoviride VS-89* и *Met. anisopliae AF-03* и органического субстрата, который показал хорошие результаты в лабораторных экспериментах по очистке почвы от сырой нефти. В качестве субстрата использовали компост высокого нагрева. После стерилизации компост заражали чистыми культурами, углеводородокисляющих микроорганизмов. В стерильные пакеты с субстратом отдельно вносили бактериальные разведения: (Часть №1, **Титр=1×10<sup>12</sup>КОЕ/г**) и разведения спор микромицетов (Часть №2, **Титр=1×10<sup>8</sup> КОЕ/г**) (рис.3).

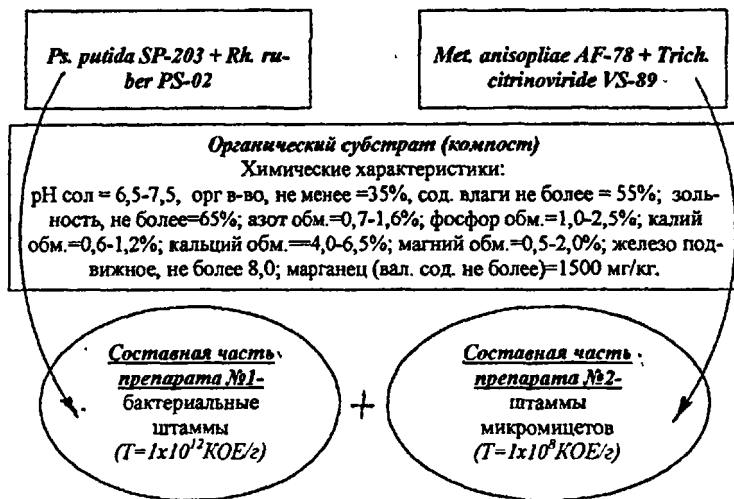


Рис 3. Структура и состав биопрепарата «Макродегрин» на основе ассоциации углеводородокисляющих штаммов микроорганизмов

### Влияния нефти на динамику численности различных групп микроорганизмов

Эффект воздействия нефти на почву проявляется в изменении комплекса почвенных микроорганизмов в целом. Нефть оказывает селекционное действие на почвенную микробиоту, вызывая изменение состава, численности и организации микробного сообщества почвы. (Пиковский, 1991; Славина, 1992; Киреева, 2001).

В лабораторном опыте по изучению динамики численности микроорганизмов в нефтезагрязненной почве с дополнительным внесением биопрепарата на основе углеводородокисляющих штаммов установлено:

Общее содержание микроорганизмов в нефтезагрязненных почвах в течение первых недель значительно снижается. При этом снижается доля доминирующих микроорганизмов контрольной почвы: *Vac. muscoides*, *Mucog. spp.* и др, и возрастает доля *Ps. spp.*, *Penicillium spp.*, *Asp. Spp* и др. Внесение в почву углеводородокисляющих микроорганизмов обеспечивает на начальном этапе

эксперимента увеличение общей численности микроорганизмов в вариантах с внесением биопрепарата.

По истечении двух и более шести месяцев эксперимента наблюдается достоверное увеличение числа гетеротрофов, микромицетов и углеводородо-кисляющих микроорганизмов в исследуемых почвах с внесением биопрепарата. В вариантах без дополнительного внесения углеводородокисляющих микроорганизмов общая численность была на порядок ниже.

Таким образом, дополнительное внесение биопрепарата повышает общую численность исследуемых групп микроорганизмов. Также нефть, за счет содержания веществ, стимулирующих рост микроорганизмов, активирует жизнедеятельность гетеротрофной и углеводородокисляющей микрофлоры.

#### Особенности микробоценозов нефтезагрязненных почв

В задачу наших исследований входило описание микробных ценозов нефтезагрязненных почв. Данные исследования по изучению нефтезагрязненных почв проведены нами впервые и представляют не только научный, но и практический интерес.

Наблюдения, проведенные в течение 10 месяцев эксперимента, показывают на доминирование в микробных пейзажах нефтезагрязненных почв гифов грибов (рис. 4)



Рис.4



Рис.5



Рис.6

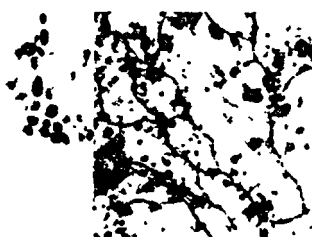


Рис.7

#### *Микробоценозы нефтезагрязненных почв (x1000)*

Часто обнаруживается обрастание мицелия бактериальными клетками, что неоднократно встречается в вариантах с нефтезагрязненной черноземной

почвой. В одних случаях это приводит к гибели и лизису гриба, в других - оба микроорганизма выигрывают от такого тесного сожительства.

Бактериальная флора нефтезагрязненных почв характеризуется четкой дифференцировкой во времени. В начальные стадии (до 2 мес.) в загрязненных нефтью почвах доминируют представители палочек разной величины (рис.5). Далее (по истечении 2 месяцев) главенствующее место занимают гифы актиномицетов и грибов. В вариантах без внесения биопрепарата часто доминируют дрожжеподобные клетки (рис.6).

Отмечена своеобразность ценозов аллювиального песка. Здесь преобладают гифы актиномицетов (рис.4) в течение практически всего эксперимента. В некоторых вариантах с нефтезагрязненным песком наблюдается обилие кокковых форм и палочек, в частности, в вариантах с внесением углеводородокисляющих микроорганизмов.

Рассматривая распределение микроорганизмов в почве необходимо подчеркнуть, что в вариантах с внесением биопрепарата в исследуемые почвы и песок наблюдается перераспределение основных доминирующих форм микроорганизмов нефтезагрязненной почвы на представителей интродуцированной ассоциации (*Trick citrinoviride*; рис. 7).

#### Исследование степени деградации нефти в почве

Первоначальное содержание нефти в почве рассматривали как 100%. К концу эксперимента (через 6 месяцев) наблюдалось достоверное снижение количества нефти во всех исследуемых вариантах (рис.8). Количество нефти снизилось в среднем на 50-60%. В вариантах с внесением биопрепарата содержание нефти понизилось на 79-82%. С наибольшей эффективностью процесс деградации нефти наблюдался в дерново-подзолистой почве (73-82%), менее активно - в черноземной почве (70-79%), наименее слабо - на речном песке (40-45%).

Следует отметить, что в нефтезагрязненных почвах более эффективным процесс окисления установлен в вариантах со среднепарафинистой нефтью

Сугмутского месторождения. В загрязненном нефтью аллювиальном песке наиболее эффективно процесс деградации наблюдался с высокопарафинистой нефтью Харьягинского месторождения (рис.8).



Рис. 8. Изменение содержания нефти по сравнению с первоначальным внесением, %. (Примечание- штриховка - варианты с внесением иефти Харьягинского месторождения, без штриховки - нефть Сугмутского месторождения.)

#### Биологический тест на токсичность почвы

При оценке токсичности загрязненных нефтью почв успешное применение находят фитопробы с тест - растениями (Фомченков и др., 1996).

Нами оценивалась степень фитотоксичности нефтезагрязненной почвы. В качестве тест объектов использовали семена тест - растений: кресс-салата (*Lepidium sativum*) и пшеницы сорта «Московская - 35» (*Triticum durum*).

Выявлено, что токсическое действие нефти на всхожесть семян тест - растений проявляется при концентрации 3% от веса почвы. Семена тест-растений частично теряют всхожесть сразу после внесения нефти. Наименьшая всхожесть наблюдается в вариантах с песком, что свидетельствует о наибольшем угнетающем действии ксенобиотика. К четвертому месяцу исследований происходит полное снижение фитотоксичности. Всхожесть семян составляет 65-80% в вариантах без внесения биопрепарата. В вариантах с внесением ассоциации углеводородокисляющих микроорганизмов всхожесть семян достигает от 85 до 95% в зависимости от типа почвы. Наибольшее снижение токсичности отмечается в вариантах с внесением среднепарафинистой нефти Сугмутского

месторождения.

В результате действия разработанного нами микробиологического препарата на основе ассоциации углеводородокисляющих микроорганизмов наблюдается снижение токсичности нефтезагрязненной почвы до уровня, не препятствующего росту и развитию тест-растений.

Таким образом, в настоящей работе представлена дополнительная информация об углеводородокисляющих микроорганизмах и испытания нового биопрепарата, показавшего высокую эффективность при очистке почв от нефти. Данные исследования открывают дальнейшие перспективы его практического использования.

## ВЫВОДЫ

1. Выделены микроорганизмы, усваивающие углеводороды нефти в качестве единственного источника углерода. Данные микроорганизмы изучены и идентифицированы: *Pseudomonas putida SP-203*, *Rhodococcus ruber PS-02*, *Trichoderma citrinoviride VS-89*, *Metarrhizium anisopliae AF-78*, *Aspergillus carneus SU-TM-03*. Являясь психроактивными, они могут быть использованы при очистке нефтезагрязненных почв в районах с непродолжительным теплым периодом.

2. Разработан оригинальный способ культивирования углеводородокисляющих микроорганизмов на компосте высокого нагрева в качестве органического субстрата. На основе выделенных штаммов микроорганизмов создан биопрепарат для борьбы с нефтезагрязнениями, на который оформляется патент Российской Федерации.

3. Результаты газохроматографического анализа и ИК-спектроскопии служат показателями изменения фракционного состава нефти при культивировании микроорганизмов на модифицированных питательных средах с добавлением нефти. Газохроматографический анализ подтверждают высокую углеводородокисляющую активность выделенной ассоциации (более 50% н-алканов за 10 дней культивирования).

4. Модифицирован и впервые использован метод Н.Г. Холодного при изучении динамики формирования структуры микробного ценоза, плотности обростания и распределения доминирующих микроорганизмов в различных типах нефтезагрязненных почв.

5. Выделенные микроорганизмы-деструкторы, участвующие в кометаболическом разложении сырой нефти, существенно снижают токсичность почв и способствуют не только прорастанию семян, но и росту тест-растений (кресс-салата и пшеницы).

6. Результаты эксперимента по очистке почв биопрепаратом показывают высокую активность микроорганизмов по отношению к углеводородам нефти (до 85% от начального содержания в почве). Разработанный биопрепарат может быть рекомендован как один из эффективных при очистке почв для ускоренной деструкции нефти и восстановления ее биологической активности.

7. Предложенная стратегия рекультивации нефтезагрязненных почв базируется на усилении биологической активности почв путем внесения ассоциации культур микроорганизмов-деструкторов.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. Павликова Т.А. Биоремедиация почвы ассоциацией углеводородокисляющих микроорганизмов //Материалы Международной научной конференции «Агрохимические аспекты повышения продуктивности сельскохозяйственных культур».- «Бюллетень ВИУА №16».- М.: Агроконсалт, 2002. - С.445-447.

2. Сидоренко О.Д., Войно Л.И., Павликова Т.А. Влияние нефти на микрофлору почв и подбор ассоциации микроорганизмов, способных к ее деструкции //Сб. докл. Всероссийской научно-технической конференции- выставки с международным участием «Качество и безопасность продовольственного сырья и продуктов питания». - М.: Изд-во МГУП, 2002. - С. 176-178.

3. Сидоренко О.Д., Павликова Т.А. Деградация нефти ассоциацией углеводородокисляющих микроорганизмов //Доклады ТСХА. Вып. 275. М.: Изд-во МСХА, 2003. - С. 265-272.

4. Войно Л.И., Павликова Т.А., Сидоренко О.Д. Устойчивость и изменение численности почвенных микроорганизмов при нефтезагрязнении почвы //Сб. докл. Всероссийской научно-технической конференции- выставки «Высокоэффективные технологии, методы и способы для их реализации». - М.: Изд-во МГУП, 2003. - С. 160-162.

3

№ 10675

427