

## Микробные биотехнологии для защиты почв

**Дмитрий Кашин,**  
ученик 10-го класса СОШ № 7, г. Пермь  
Научный руководитель  
**И.А. Баскевич**

### Химическое загрязнение почв на территории Пермского края и технологии их очистки

Пермский край — промышленный регион России. Наиболее развитые отрасли промышленности в крае — нефтяная, химическая и нефтехимическая, машиностроение, чёрная и цветная металлургия, лесопромышленный комплекс. В связи с этим проблема оценки состояния почв, связанная с загрязнением их отходами производства и потребления, выбросами в атмосферный воздух от стационарных и передвижных источников, применения агрохимикатов, весьма актуальна для Пермского края.

Специфика экономики края как нефтегазодобывающего и нефтеперерабатывающего региона требует оценить степень загрязнения окружающей среды сырой нефтью, нефтепродуктами, **полиароматическими углеводородами (ПАУ), полихлорированными бифенилами (ПХБ)** и разработать эффективные методы её очистки. Нефть, являясь экологически опасным веществом, при попадании в почву и водоёмы нарушает, угнетает и заставляет протекать иначе все жизненные процессы. Нефтяное загрязнение наносит жестокий удар по водным и почвенным экосистемам, нарушая биологическое равновесие и биоразнообразие и вызывая в них значительные, зачастую необратимые изменения.

Актуальна и проблема засоления почв, связанная с деятельностью крупнейших предприятий Березниковско-Соликамского промышленного узла — ОАО «Уралкалий» и ОАО «Сильвинит». Эти предприятия занимаются добычей руды и производством калийных удобрений. ОАО «Уралкалий» в числе самых развитых и крупномасштабных производителей минеральных удобрений.

Присутствие на территории Пермского края крупнейших нефтедобывающих, нефтегазотранспортных и горнодобывающих компаний обуславливает необходимость развития и внедрения биотехнологий для защиты окружающей среды в целом и почвы в частности от существующих и возможных аварийных загрязнений.

## Технологии защиты окружающей среды

В мировой практике для обезвреживания почвы, загрязнённой нефтепродуктами, применяются физические, химические, физико-химические, биологические и другие методы.

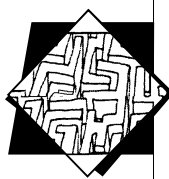
**Биологические методы разложения загрязнителей в почве.** Наиболее экологически безопасны и перспективны комплексные биотехнологические подходы, которые получили название биоремедиации и фитобиоремедиации: обработка почвы селекционированными нефтеокисляющими штаммами микроорганизмов в сочетании с введением комплексных минеральных удобрений и высевом нефтеустойчивых растений; обработка нефтезагрязнённой почвы стимуляторами роста аборигенной нефтеокисляющей микрофлоры. Эти технологии в настоящее время — широко применяемые и эффективные биотехнологические методы ликвидации нефтяного загрязнения почвы.

Биологические методы справедливо признаны в мире наиболее безопасными для окружающей среды и экономически целесообразными. Особенно перспективен метод биоремедиации, основанный на использовании микроорганизмов, способных утилизировать углеводороды в процессе своей жизнедеятельности. В процессе биоремедиации углерод из нефти и нефтепродуктов частично преобразуется в углекислый газ, частично переходит в биомассу клеток и частично трансформируется в гумус и закрепляется в почве. В настоящее время изучению этой проблемы посвящено большое число научных исследований и интерес к этой тематике растёт. Научные лаборатории мира продолжают разрабатывать препараты-нефтедеструкторы, действие которых основано на использовании уникальных возможностей углеводородоокисляющих микроорганизмов, входящих в их состав.

## Разработки ИЭГМ УрО РАН

Лидер в области разработки и внедрения биотехнологий на территории Пермского края и России — Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН.

Микроорганизмы, обладая уникальными возможностями адаптироваться к экстремальным факторам окружающей среды, способны выживать и быть устойчивыми к довольно высоким концентрациям загрязнителей, способны разрушать различные классы химических соединений, трансформировать их в менее токсичные, а также синтезировать различные соединения, позволяющие им выживать в условиях изменённой среды. Такие высокие адаптационные возможности бактерий обусловлены наличием у них генов, чётко контролирующих синтез специальных белков, которые выполняют регуляторные или каталитические (ферменты) функции, тем самым обеспечивая своевременное



переключение обмена веществ в микробной клетке строго в соответствии с потребностями выживания в изменяющихся условиях. Для разложения различных классов химических веществ микроорганизмы обладают различными ферментами или целым набором ферментов, синтез которых контролируется работой соответствующих генов или одновременно целого ансамбля генов.

Наиболее перспективным представляется использование *биосурфактантов* микробного происхождения, ибо они характеризуются низкой токсичностью, лёгкой биodeградебельностью, устойчивой активностью в экстремальных условиях среды. Известно, что активными продуцентами биосурфактантов являются актинобактерии рода *Rhodococcus*. Установлено, что синтез биосурфактантов клетками родококков происходит только в присутствии жидких углеводов; биосурфактанты представляют собой гликолипидные комплексы с широким спектром функций.

В результате многолетних исследований учёных Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН разработана и внедрена научно-обоснованная система оценки и реабилитации нарушенных и загрязнённых углеводородами природных экосистем с использованием высокоэффективных биотехнологических методов в условиях северных регионов Российской Федерации. Для восстановления техногенно-нарушенных и загрязнённых территорий разработаны и применены в промышленных масштабах инновационные технологии биоремедиации, основанные на использовании биосурфактантов для повышения биодоступности углеводородных загрязнителей; на создании комплексных биопрепаратов, активных в широком диапазоне природных условий; на поэтапной переработке отходов нефтегазовой промышленности в твёрдо-жидкофазном биореакторе и аэрируемых площадках; на использовании биосорбентов из отходов сельского хозяйства и лесной промышленности. Массив биологической информации, полученной при выполнении исследований включён в автоматизированный Каталог штаммов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ, установлен в консолидированном Каталоге микроорганизмов Российских коллекций, Всемирном центре данных о микроорганизмах (World Data Centre for Microorganisms – WDCM, Mishima, Japan) и доступен в сети Интернет.

В настоящее время объём коллекционного генофонда составляет две тысячи идентифицированных непатогенных штаммов, выделенных из многих тысяч образцов почв, поверхностных и пластовых вод, снега, воздуха, зерна, отобранных из контрастных эколого-географических регионов. Ценность коллекции в том, что многие виды бактерий представлены многочисленными природными изолятами из разных мест ареала с охватом основных географических зон бывшего СССР. Это позволяет, с учётом экологической пластичности видов, целенаправленно вести отбор

эффективных биотрансформаторов органических соединений и биопродуцентов ценных веществ.

Существуют различные способы ремедиации почв. Биоремедиация почв и других объектов окружающей среды с использованием микроорганизмов-деструкторов ПАУ и ПХБ имеет ряд известных преимуществ по сравнению с другими методами.

К настоящему времени обнаружены и описаны бактерии различных эволюционных групп, способные разлагать нафталин, фенантрен, антрацен, другие высокомолекулярные ПАУ. Способность к трансформации ПХБ описана для широкого круга бактерий, которые могут полностью разлагать моно- и дихлорбифенилы. Большинство известных штаммов-деструкторов трансформируют ПХБ до соответствующих хлорбензойных кислот (ХБК). Последующие этапы деградации хлорбензоатов в микробных системах осуществляют обычно другие группы организмов. Среди них значительна роль бактерий, осуществляющим отщепление галогена на первых этапах разложения хлорбензоатов, в результате чего образуются менее токсичные соединения, доступные к использованию в качестве субстрата для многих почвенных микроорганизмов. Всё вышесказанное определяет актуальность и перспективность фундаментальных и прикладных исследований в этом направлении.

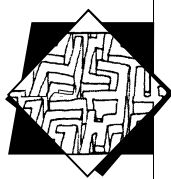
**Цель работы:** определить наиболее эффективные биотехнологические решения для снижения уровня загрязнения ПАУ, ПХБ, углеводов.

Для реализации цели в работе были поставлены следующие **задачи:**

- 1) произвести отбор проб почв/грунтов, загрязнённых отходами химических и соледобывающих производств Верхнекамского калийного месторождения;
- 2) определить химические вещества, содержащиеся в пробах на предмет определения в них сложных органических соединений (ПАУ и ПХБ);
- 3) выделить из проб, отобранных из объектов окружающей среды на территории БКПРУ 1, штаммы бактерий-деструкторов нефтехимических загрязнений;
- 4) исследовать микроорганизмы, которые способны выживать в условиях высокой засоленности и осуществлять деструкцию химических загрязнений;
- 5) сформировать кадастр предприятий Пермского края, имеющих сходные экологические проблемы, и предложить рекомендации по использованию эффективных технологий защиты окружающей среды.

**Практическая ценность:**

- 1) Полученные данные о способности аэробных бактерий разлагать нефть и ароматические соединения при повышенной солёности среды расширяют представления о системах биodeградации ПАУ и могут быть использованы для создания новых эффективных биотехнологий восстановления окружающей среды.



2) Выделенные и охарактеризованные уникальные штаммы-деструкторы ПХБ могут применяться для восстановления почв и водоёмов, загрязнённых ПХБ, а также в технологиях детоксикации промышленных смесей, содержащих хлорбифенилы.

3) Создана обширная рабочая коллекция бактерий-деструкторов ароматических соединений, доступных для фундаментальных и научно-прикладных исследований специалистов разного профиля.

### **Степень загрязнения и возможности применения биотехнологий для защиты почв**

Почва — один из объектов экологического мониторинга на территории Пермского края наряду с атмосферным воздухом, снежным покровом, водными объектами. Однако постоянный мониторинг состояния загрязнения почв на территории всего Пермского края проводится только по тяжёлым металлам, радиологическим и санитарным показателям. С 1991 года специалисты Федерального государственного учреждения Государственный центр агрохимической службы «Пермский» приступили к изучению влияния сельскохозяйственной деятельности и применяемых средств химизации на совокупность свойств почв, урожая сельскохозяйственных культур и его качества, которое осуществляется на стационарных реперных участках в соответствии с Всероссийской программой мониторинга почв. Было заложено 16 реперных участков в разных районах края. Они размещены во всех природно-климатических районах на типичных ландшафтах. Кроме реперных участков, содержание тяжёлых металлов определяется в массовых почвенных образцах, которые отбираются на территории всех районов края.

Предприятия ОАО «Уралкалий» и ОАО «Сильвинит» входят в «восьмёрку» предприятий-лидеров по объёму валовых выбросов ЗВ в атмосферу.

Исследования проводились на одной из промышленных площадок ОАО «Уралкалий» Березниковского калийного производственного рудоуправления № 1 (БКПРУ-1). ОАО «Уралкалий» — крупнейшее предприятие Березниковско-Соликамского промузла и одно из крупнейших в Пермском крае. Территория промплощадки БКПРУ-1 подвергается высокой химической нагрузке вследствие производственной деятельности предприятия и характеризуется высокой степенью засоления почв и водных объектов в связи с близостью солеотвалов. Эти факторы определяют специфическое воздействие на природные экосистемы, в том числе на почвенную микрофлору.

**Отбор проб.** Отбор проб почвы и грунтов проводился на территории площадки БКПРУ-1 в радиусе 50–100 м от солеотвала в местах наибольшего загрязнения органическими веществами

и высокой минерализации. Пробы в количестве 1 кг отбирались на глубине до 10 см и помещались в стерильные полиэтиленовые пакеты. Пробы донных отложений отбирались в вододерживающих системах на глубине 0,2–0,5 метра специальными пробоотборниками в количестве до 0,5 кг и также помещались в стерильные полиэтиленовые пакеты. Пробы в течение суток транспортировали в лабораторию ИГИЭМ УрО РАН.

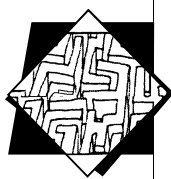
**Определение спектра загрязняющих веществ.** Химический анализ проб был произведён в лаборатории ИГИЭМ УрО РАН. С помощью метода хроматомасспектрометрии в пробах почвы, грунтов и донных осадков с промышленной площадки БКПРУ-1 было определено присутствие широкого спектра углеводов, включая ароматические соединения (нафталин, 3,4-бензпирен и др.). Методом атомно-адсорбционной спектрометрии зарегистрировано высокое содержание минеральных соединений натрия, калия, магния.

### Оценка возможности очистки почвы

Для выбора наиболее подходящего метода очистки почв от химического загрязнения в районах промплощадки и солеотвала на территории БКПРУ-1 на первом этапе необходимо было произвести выделение из проб селективных бактериальных культур, способных сохраняться в почвенном субстрате в условиях повышенной засоленности. На втором этапе — произвести оценку способностей выделенных накопительных культур к разложению загрязняющих веществ.

**Выделение накопительных культур.** Из проб почв, грунтов и донных отложений, отобранных на территории БКПРУ-1, при перемешивании были взяты образцы для получения накопительных культур микроорганизмов. Накопительные культуры получали на жидкой минеральной среде с добавками ароматических и хлорированных углеводов (дизельное топливо, нафталин, бифенил, хлорированные бифенилы) и NaCl в концентрациях от 0,2 до 0,6%. Культивирование проводили при температуре +28°C при постоянном перемешивании на термостатируемом шейкере в течение 7–30 суток. Для выделения чистых культур микроорганизмов использовали твёрдые агаризованные среды. Весь комплекс исследований по таксономическому, физиологическому, биохимическому и генетическому анализам проводился при поддержке научных сотрудников лаборатории ИЭГМ УрО РАН.

**Материалы, реактивы, ферменты.** Для приготовления минеральных и питательных сред использовались реактивы фирм: «Sigma», США; «Fluka», США; «Difco», США. Ферменты и реактивы для молекулярно-биологических исследований фирм: «New England Biolabs», США; «Mannheim», Germany; «Gibco BRL», США; «Sigma», США; «Merck Darmstadt», Germany; «Bio-Rad Rad Laboratories», США; «Fermentas», Литва; «Силекс», Россия.



**Среды и условия культивирования.** Для выделения и роста бактерий-деструкторов использовали минеральную среду К1 (*Зайцев, Карасевич, 1981*). Для выделения и роста галофильных/галотолерантных бактерий использовали минеральную среду Раймонда (среда Р) (*Розанова, Назина, 1982*). NaCl добавляли до конечных концентраций – от 0,5 до 9,0% (вес/объём). При необходимости в среды культивирования добавляли витамины: биотин, тиамин, рибофлавин, инозитол.

В качестве полноценной среды для галофильных/галотолерантных бактерий использовали модифицированную среду Раймонда (среда МР) при добавлении триптона и дрожжевого экстракта в качестве ростовых субстратов.

Для получения агаризованной среды добавляли агар до конечной концентрации 1,5%. При выращивании микроорганизмов на агаризованных средах нафталин, бифенил, толуол, бензол, фенол, октан добавляли на крышку перевернутой чашки Петри.

Чистые культуры бактерий поддерживали на селективных агаризованных средах и хранили в глицерине при  $-80^{\circ}\text{C}$  в высушенном состоянии.

Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) определяли методом серийных разведений с последующим высевом и подсчётом колоний бактерий на чашках с полноценной агаризованной средой (*Веслополова, 1995*). Кинетические характеристики растущей периодической культуры определяли согласно (*Перт, 1978*).

**Полученные накопительные культуры.** В работе были получены различные варианты накопительных культур из образцов почв, отобранных на территории БКПРУ-1. Накопительные культуры различались источниками углерода, содержанием хлорида натрия в ростовой среде. Варианты накопительных культур:

1) на минеральной среде К1 с нафталином (фенантроном, бифенилом, ХБК) в качестве единственного источника углерода и энергии;

2) на среде Раймонда, содержащей разные концентрации NaCl (от 0,5% до 7%) с теми же субстратами;

3) на среде МР, содержащей разные концентрации NaCl (от 0,5% до 20%).

Образцы (1 г) вносили в колбы (объём 250 мл), содержащие 100 мл минеральной среды (К1, Р или МР). Инкубация проводилась от одного до четырёх месяцев при  $28^{\circ}\text{C}$ . Ассоциации бактерий выделяли путём многократных пересевов накопительной культуры и культивировании при вышеперечисленных условиях. Чистые культуры бактерий выделяли на полноценных агаризованных средах.

Методом накопительного культивирования из техногеннозагрязнённых почв, грунтов и донных отложений было выделено около 240 штаммов-деструкторов нафталина и фенантрена. Данные анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК,

морфологических, физиолого-биохимических и хемотаксономических особенностей изолятов позволили установить принадлежность выделенных штаммов к родам *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Dietzia*, *Kocuria*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Janibacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus* и *Pseudomonas*.

**Бактерии рода *Arthrobacter*.** Восемь штаммов рода *Arthrobacter*, выделенные из почв района солеразработок, были подробно охарактеризованы. Изоляты имели круглые, выпуклые, гладкие, не прозрачные колонии бледно-жёлтого цвета; клетки изолятов неподвижные, не образуют спор, обладают чётко выраженным жизненным циклом.

**Бактерии рода *Rhodococcus*.** Выделены двенадцать бактерий-деструкторов рода *Rhodococcus*.

Штаммы на полноценной агаризованной среде образовывали разные по морфологии колонии: выпуклые блестящие гладкие кремового цвета с ровным краем, шероховатые матовые кремового цвета с лопастным краем, выпуклые блестящие кремового цвета с ризовидным краем и выпуклые блестящие колонии красного цвета.

Все выделенные бактерии относятся к классу наиболее перспективных *биосурфактантов* микробного происхождения, ибо они характеризуются низкой токсичностью, лёгкой биodeградальностью, устойчивой активностью в экстремальных условиях среды. Известно, что активными продуцентами биосурфактантов являются актинобактерии рода *Rhodococcus*. Установлено, что данные накопительные культуры в условиях повышенной солёности могут не только нормально существовать в таких условиях, но и сохранять способность к разложению углеводов, ПАУ, ПХБ и прочих соединений.

Накопительные культуры, выделенные в ходе работы, могут быть использованы в решении экологических проблем по очистке почв от химического загрязнения углеводородами, ПАУ, ПХБ и других подобных веществ на следующих предприятиях Пермского края:

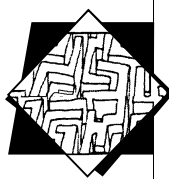
- 1) нефтедобывающих предприятиях, расположенных на территории Гремячинского, Верхнекамского, Пермского районов;
- 2) нефтеперерабатывающих предприятиях – ОАО «Лукойл», нефтехимическом предприятии «Пермнефтеоргсинтез»;
- 3) предприятиях электроэнергетики – ОАО «Пермэнерго»;
- 4) химических заводах – ОАО «Уралкалий», ОАО «Сильвинит», «Галоген», ОАО «Бератон».

Алгоритмизация анализа влияний загрязнений и степени воздействия на окружающую среду, выделение предприятий высокого риска по формированию химического загрязнения в настоящий момент находится в разработке.

## Заключение

В ходе работы из отобранных проб были выделены образцы микроорганизмов, способных разрушать ароматические углеводо-





роды и полихлорированные бифенилы при повышенной минерализации (NaCl) ростовой среды.

В результате исследований выделено 8 штаммов бактерий-деструкторов рода *Arthrobacter*, и 12 бактерий-деструкторов рода *Rhodococcus*, способных утилизировать различные ароматические и хлорированные углеводороды в условиях повышенного засоления среды. Микробная деструкция ПАУ при повышенной солёности среды крайне важна. Микроорганизмы, способные расти и осуществлять деструкцию углеводородов в таких «неблагоприятных» условиях, играют важную роль в биоремедиации экстремально загрязнённых объектов окружающей среды. Изучение биодеструкции углеводородов в присутствии повышенных концентраций солей представляет интерес в связи с острой проблемой очистки почв в местах сосредоточения промышленных предприятий по добыче и переработке нефти, соледобычи, а также очистки техногенных сточных вод и высокоминерализованных водоёмов, загрязнённых токсичными соединениями. Кроме того, исследования галофильных/галотолерантных бактерий и их сообществ, способных разрушать ПАУ в присутствии высокой солёности среды, имеют большое фундаментальное значение, поскольку расширяют представления о физиологических, молекулярно-биологических особенностях микроорганизмов и характере взаимодействий бактерий в микробных сообществах.

Проблема очистки наземных и водных экосистем, загрязнённых токсичными, устойчивыми к разложению и представляющими опасность для здоровья человека химическими соединениями, занимает центральное место в ряду актуальных задач современной экологии.

Чтобы представить, насколько масштабны и страшны инциденты такого рода и насколько важно использовать правильные, заранее рассчитанные технологии их ликвидации, достаточно вспомнить об экологической катастрофе, произошедшей в Мексиканском заливе летом 2010 г на одной из платформ кампании «Бритиш Петролеум». В России при добыче, транспортировке, переработке и использовании нефти и нефтепродуктов ежегодно теряется около 10 млн. тонн «чёрного золота»!

Нефть — неоднородное вещество. В её состав входят соединения, обладающие канцерогенными и мутагенными свойствами, а также тенденцией к биоаккумуляции. Наиболее распространённые из известных науке — полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). Они поступают в окружающую среду с разливами нефти, отходами коксохимических, газоперерабатывающих производств и химических предприятий, образуются при неполном сгорании топлива и бытовых отходов.

Для окружающей среды более опасны полихлорированные бифенилы (ПХБ). Они широко применялись в течение нескольких десятилетий при производстве лакокрасочных материалов,

пластификаторов, пестицидов, в электротехнической промышленности. В настоящее время производство и использование ПХБ, как особо стойких органических загрязнителей, запрещено Стокгольмской Конвенцией.

Воздействию вышеперечисленных веществ с учётом путей их поступления в окружающую среду наибольший экологический ущерб несут почвы и водные объекты. Поэтому главная задача экологов — восстановление почв, водных объектов. Наряду с задачами по восстановлению почв, загрязнённых этими группами токсикантов, остро стоит проблема детоксикации больших объёмов невостребованных коммерческих смесей, созданных на основе хлорированных бифенилов.

### Библиографический список

1. *Ананьина Л.Н., Алтынцева О.В., Плотникова Е.Г.* Изучение сообщества микроорганизмов, выделенного из района солеразработок // Вестник Пермского университета. Серия биология. 2005. Вып. 6. С. 109–114.
2. *Андерсон Р.К.* Использование микробиологического метода для очистки нефтезагрязнённых почв / Р.К. Андерсон, Ф.Я. Багаутдинов, Т.Ф. Бойко и др. // Интродукция микроорганизмов в окружающую среду: тез. докл. междунар. конф. М., 1994. С. 10.
3. *Алтынцева О.В., Плотникова Е.Г., Демаков В.А.* Микробная деструкция полиароматических углеводов в условиях повышенного засоления среды // 4-й Международный семинар-презентация инновационных научно-технических проектов «Биотехнологии 2000». Пушино. 2000. С. 73.
4. *Бердичевская М.В.* Особенности физиологии разрабатываемых нефтяных залежей // Микробиология. 1989. № 1. С. 60–65.
5. *Егорова Д.О., Плотникова Е.Г., Демаков В.А.* Биоремедиация почв, загрязнённых полихлорированными бифенилами, грамположительными бактериями // Актуальные проблемы микробиологии и биотехнологии: Материалы Международной научной конференции. Кишинев. 2009. С. 24–25.
6. *Егорова Д.О., Шумкова Е.С., Демаков В.А., Плотникова Е.Г.* Разложение хлорированных бифенилов и продуктов их биоконверсии штаммом *Rhodococcus* sp. В7а // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т. 46, № 6. С. 644–650.
7. *Зайцева Е.А., Осипова Т.А.* Изучение биокатализаторов и возможностей их практического использования в рамках федеральной целевой научно-технической программы России «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники» // Вестник Московского университета. Сер. 2. Химия. 2006. Т. 47. № 1.
8. *Рыбкина Д.О., Плотникова Е.Г.* Исследование способности штаммов-деструкторов бифенила к разложению хлорароматических ксенобиотиков // Материалы международной конференции «Татищевские чтения: Актуальные проблемы науки и практики-2004». Тольятти. 2004. С. 226–230. 