

Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение г. Иркутска
средняя общеобразовательная школа №24, Иркутск, Россия¹

Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение г. Иркутска
средняя общеобразовательная школа №19, Иркутск, Россия²

ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ БАКТЕРИЙ *RHODOCOCCLUS* *ERYTHROPOLIS* ВОССТАНАВЛИВАТЬ НЕФТЕЗАГРЯЗНЁННУЮ ПОЧВУ И ДЕСТРУКТИРОВАТЬ ОТДЕЛЬНЫЕ УГЛЕВОДОРОДЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НЕФТИ

Статья посвящена актуальной на сегодняшний день проблеме процессу биодеструкции нефти с помощью бактерий. Данные, полученные в результате исследований, расширяют современное представление о роли ризосферных микроорганизмов в процессе биоремедиации нефтезагрязнённых почв. Исследования способствуют разъяснению процесса нефтедеструкции и степени участия микроорганизмов-биодеструкторов в ней. В рамках исследования изучена способность *Rhodococcus erythropolis* к деструкции углеводородов, входящих в состав нефти.

Ключевые слова: бактерии-нефтедеструкторы, *Rhodococcus erythropolis*, биоремедиация, алканы, ароматические углеводороды.

В настоящее время нефть является одним из основных загрязнителей окружающей среды. Основную нагрузку при этом испытывает почва, за счет своей способности аккумулировать загрязнения в больших количествах, что приводит к изменению физических, агрохимических и микробиологических её характеристик [4]. В связи с тем, что процесс самоочищения почвы загрязненной нефтью очень продолжительный и может достигать 30 лет, особенно в условиях Сибири, где долгое время держится пониженная температура, необходима разработка технологий очистки почвы от нефти [9]. В настоящее время наиболее эффективным, экономичным и экологически безопасным методом является биоремедиация на основе различных микроорганизмов, способных разлагать углеводороды нефти. При биоремедиации предпочтительно использование местных видов микроорганизмов, которые адаптированы к климатическим и экологическим условиям Сибирского региона.

Бактерия *Rhodococcus erythropolis* выделена ризосферы пырея (*Elytrigia repens*) с нефтезагрязненной территории Иркутской области (п. Тыреть,

Заларинский район, в 1993 году в данной местности произошёл крупный разлив нефти) [10].

Целью данного исследования стало изучение способности *Rhodococcus erythropolis* к биоремедиации нефтезагрязнённой почвы и деструкции отдельных углеводов, содержащихся в нефти.

Поскольку любая почва в той или иной мере содержит органические элементы, для изучения способности бактерий *Rhodococcus erythropolis* к биоремедиации почв, загрязнённых нефтью, проводили исследование деструктирующей способности бактерий на песке. Песок не содержит органики, а потому использование песка предпочтительно по сравнению с почвой, так как бактерии будут утилизировать только нефть, не поедая органические остатки [8].

В начале эксперимента в ёмкости вносили по 100 грамм предварительно прокалённого песка. Добавляли нефть в концентрациях 5, 10, 15% от массы песка. Увлажняли песок стерильной дистиллированной водой, внося по 19 мл воды на 100 грамм песка. В ёмкости с песком добавляли по 5 мл бактериальной суспензии *Rhodococcus erythropolis* (108) в концентрации 10^7 КОЕ/мл. И оставляли культивироваться при температуре 25°C на 10 суток [9].

Через 10 дней экстрагировали нефть из песка. Для этого 100 грамм песка заливали 20 мл гексана (C_6H_{14}) (1 сорт) в колбе, встряхивали для перемешивания. Химические свойства гексана благоприятны для количественного извлечения нефтепродуктов из почвы. Этот растворитель используют для разработки ускоренных вариантов метода оценки степени загрязнения почв нефтью [7]. Экстрагирование производили до тех пор, пока раствор не становился прозрачным. Использовали фильтр красная лента. Колбы с экстрагированной нефтью высушивали под вытяжкой в течение 2 суток. По истечении 2 суток колбы с экстрагированной нефтью взвешивали. Контролем служил песок, загрязнённый нефтью, без внесения микроорганизмов.

В результате исследований было установлено, что бактерии проявили способность к деструкции нефти, содержащейся в песке (Табл. 1). Наиболее эффективно деструкция нефти происходила в образцах с меньшей долей загрязнения нефти (5, 10%). Однако было показано, что *Rhodococcus erythropolis* способен не только выживать в концентрации нефти 15%, но и утилизировать нефть. Убыль нефти в данном варианте составила 5%.

Таблица 1 - Убыль нефти в загрязненной почве при добавлении *Rhodococcus erythropolis* через 10 суток, %

Образец	Убыль нефти относительно контроля, %
5% с бактериями	24±1,2
10% с бактериями	12,8±0,64
15% с бактериями	5±0,25

Одним из объективных показателей биодеструкции нефти бактериями в почве является снижение содержания серы, поскольку бактерии окисляют серу до водорастворимых ионов-сульфатов (SO_4 , S_2O_3 , SO_2 и других) [5]. Поэтому была проведена оценка содержания серы (мг/кг нефти) в образцах с нефтью, экстрагированной из песка без бактерий и с добавлением *Rhodococcus erythropolis* [2]. Наличие серы определяли методом рентгенофлуоресцентной спектроскопии с помощью энергодисперсионного анализатора серы («Спектроскан S», Россия).

Таблица 2 - Содержание серы в загрязненной почве без внесения бактерий и при добавлении *Rhodococcus erythropolis* через 10 суток культивирования

Образец	Содержание серы, мг/кг	Образец	Содержание серы, мг/кг
5 % без бактерий	3100±155	5 % с бактериями	2850±142,5
10 % без бактерий	5770±288,5	10 % с бактериями	5450±272,5
15 % без бактерий	7320±366	15 % с бактериями	6920±346

Было показано, что в образцах, которые культивировались совместно с бактериями, содержание серы было ниже, чем в образцах без микроорганизмов (Табл. 2). На основании данной информации можно сделать вывод о деструкции нефти *Rhodococcus erythropolis*.

Далее исследовали способность *Rhodococcus erythropolis* к деструкции отдельных углеводородов, содержащихся в нефти. Для эксперимента были выбраны предельные углеводороды (декан и гептан), поскольку они составляют большую часть лёгких фракций нефти [3], и трудно разлагаемые ароматические углеводороды (толуол и ксилол). Ароматические углеводороды – наиболее токсичные компоненты нефти. В концентрации всего 1% в воде они убивают все водные растения; нефть, содержащая 38% ароматических углеводородов, значительно угнетает рост высших растений. С увеличением ароматичности нефти увеличивается ее гербицидная активность. Содержание ароматических углеводородов в нефти изменяется от 5 до 55%, чаще всего от 20 до 40% [1].

В начале эксперимента 2-х суточную культуру микроорганизмов (по 1 мл бактериальной суспензии, оптическая плотность = 0,681) вносили в 10 мл минеральной среды с глюкозой (Табл. 3). Затем в колбы вносили нефтепродукты (декан, гептан, ксилол, толуол) в концентрации 5% от массы среды с бактериями. Контролем служили образцы с внесением нефтепродуктов и 1 мл стерильной дистиллированной воды. Культивировали 10 суток при температуре 26°C в темноте в качальной комнате.

Таблица 3 - Состав жидкой минеральной среды, г/л водопроводной воды

NaNO ₃	3,0
KH ₂ PO ₄ · 3H ₂ O	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
KCl	0,5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
C ₆ H ₁₂ O ₆	5

Через 10 суток определяли изменения состава соединений методом газовой хроматографии [3]. Для этого использовали газовый хроматограф «GC-2014» («Shimadzu», Япония) с кварцевой капиллярной колонкой HP-5 (30 м × 0,32 мм × 0,25 мкм). В качестве газа-носителя использовали гелий. Линейная скорость 34,6 м/с. Температура инжектора и детектора 300°C. Убыль углеводородов определяли вычислением отношения площади пика исследуемого образца к площади пика контроля, переводили в проценты. Пиками, время выхода которых от 3.00 до 3.50 (от 4.00 до 4.50 в варианте с ксилолом и бактериями) было решено пренебречь, поскольку данные хроматографические пики отображают состав минеральной среды, а не исследуемых углеводородов.

Было установлено, что *Rhodococcus erythropolis* (108) обладает высокой способностью деструктировать углеводородные соединения нефти. Так, ксилол ((CH₃)₂C₆H₄) был частично деструктирован бактериями (Рис. 1). Убыль соединения составила 49%. Толуол (C₆H₅-CH₃) был практически полностью разрушен бактериями (Рис. 2). Ни один из пиков, замеченный на хроматографии без бактерий, не был обнаружен на хроматографии толуола, культивируемого с *Rhodococcus erythropolis* (108), следовательно, степень деструкции данного соединения составила около 99%.

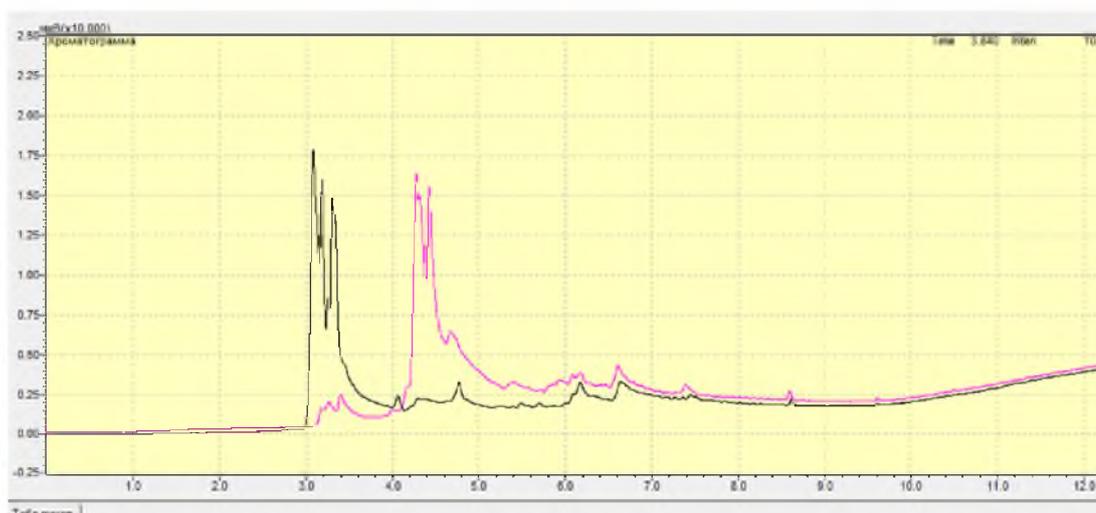


Рисунок 1. Газовая хроматография. Ксилол (концентрация в среде 5%). Черная линия – ксилол без бактерий, розовая линия – ксилол с *Rhodococcus erythropolis* (108)

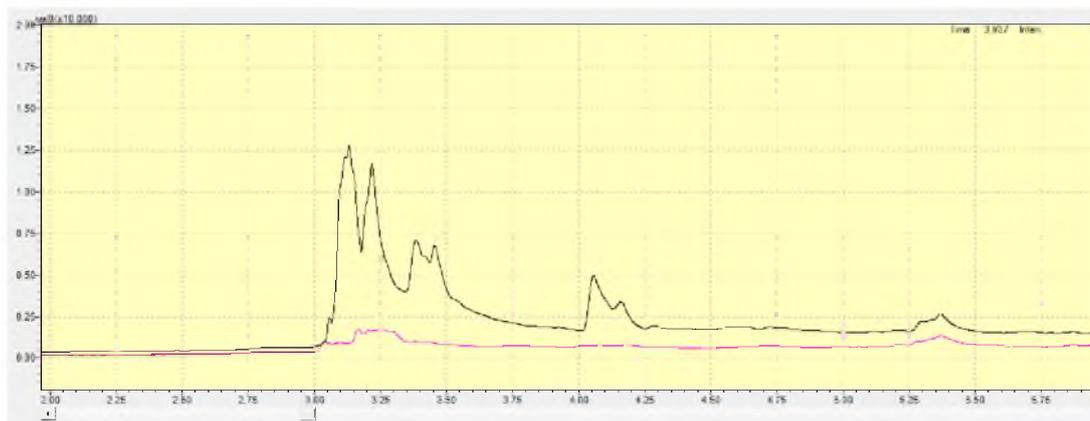


Рисунок 2. Газовая хроматография. Толуол (концентрация в среде 5%). Черная линия – толуол без бактерий, розовая линия – толуол с *Rhodococcus erythropolis* (108)

Также бактерии эффективно разрушали предельные углеводороды. У декана ($C_{10}H_{22}$) пик, который выделялся во время хроматографии на промежутке 5.40-5.50, стал значительно ниже, что говорит о частичной утилизации этого соединения бактериями (Рис. 3). Утилизация данного углеводорода составила 80,8%. Гептан (C_7H_{16}) был также эффективно переработан бактериями. Пик, замеченный на хроматографии контрольного образца на 3.75 минуте, значительно уменьшился в варианте с добавлением *Rhodococcus erythropolis*, утилизация гептана составила 99,7% (Рис. 4).



Рисунок 3. Газовая хроматография. Декан. Черная линия – декан без бактерий, розовая линия – декан с *Rhodococcus erythropolis* (108)

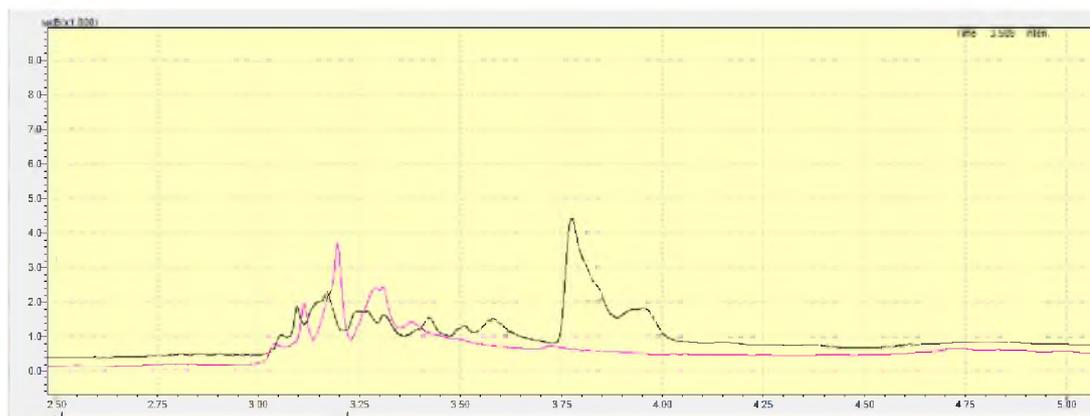


Рисунок 4. Газовая хроматография. Гептан. Черная линия – гептан без бактерий, розовая линия – гептан с *Rhodococcus erythropolis* (108)

Таблица 4 - Степень утилизации углеводородов бактериями *Rhodococcus erythropolis* (108) через 10 суток культивирования, %

Исследуемые углеводороды	Степень утилизации, %
Ксилол	49
Толуол	99
Декан	80,8
Гептан	99,7

По результатам эксперимента можно сделать вывод о высокой способности *Rhodococcus erythropolis* (108) к деструкции отдельных углеводородов, входящих в состав нефти. (Табл. 4). Высокая степень деструкции углеводородов достигалась за счёт выделения *Rhodococcus erythropolis* (108) ферментов ди- и монооксигеназ, которые являются ключевыми в атаке ароматических колец. А также ферментов гидроксилаз, которые способствуют разрушению предельных углеводородов [19]. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования бактерий для биоремедиации и очистки загрязнённых почв от токсичных соединений.

Таким образом, было установлено, что бактерии *Rhodococcus erythropolis* проявили высокую способность к деструкции отдельных углеводородов, входящих в состав нефти, что говорит о перспективности использования

бактерий для биоремедиации и очистки загрязнённых почв от токсичных соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Восстановление нефтезагрязнённых почвенных экосистем / Под ред. М.А. Глазковской.- М. Наука, 1988. – 264 с.
2. ГОСТ Р ЕН ИСО 14596-2008. Нефтепродукты. Определение содержания серы методом рентгенофлуоресцентной спектрометрии с дисперсией по длине волны. – М.: Стандартинформ, 2009.
3. Другов Ю.С. / Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов // Ю.С. Другов, А.А. Родин. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2014. – 270 с.
4. Леднев А.В. / Изменение свойств дерново-подзолистых суглинистых почв под действием загрязнения продуктами нефтедобычи и приемы их рекультивации // Автореф. дис. ... доктора с-х наук: 06.01.03. –Ижевск, 2008. – 43 с.
5. Микробиологический способ снижения содержания серы и азота в нефти и сероводорода в пластовых водах и попутных газах // Патент России № 2137839. 1999. Бюл. № 33. / Курашов В.М.
6. Плотникова Е. Г. / Бактерии-деструкторы ароматических углеводородов и их хлорпроизводных: разнообразие, особенности метаболизма, функциональная геномика // Автореф. дис. ... доктора биол. наук: 03.02.03 – Пермь, 2010. – 60 с.
7. Почвенно-экологический мониторинг и охрана почв: Учеб. Пособие / Под ред. Д.С. Орлова, В.Д. Василевской. - М.: МГУ, 1994. - 272с.
8. Рогозина Е.А. / Сравнительная характеристика отечественных биопрепаратов, предлагаемых для очистки почв и грунтов от загрязнения нефтью и нефтепродуктами // Е.А. Рогозина, О.А. Андреева, С.И. Жаркова, Д.А. Мартынов, Н.А. Орлова /// Нефтегазовая геология. Теория и практика. – 2010. – Т.5, № 3. – с. 1 – 18.
9. Руденко Е.Ю. / Биоремедиация нефтезагрязненных почв органическими компонентами отходов пищевой промышленности // Самар. Гос. Техн. Университет – Самара: СамГТУ, 2015 – с. 4 – 5
10. Третьякова М.С. / Перспективы использования эндо- и ризосферных микроорганизмов для восстановления загрязненных нефтью почв // Автореф. дис. ... кандидата биол. наук: 03.02.08 – Иркутск, 2018. – 21 с.

A. R. Nikulina¹, L. V. Bubnova^{1,2}

*Municipal budget educational institution of Irkutsk secondary school № 24,
Irkutsk, Russia¹*

*Municipal budget educational institution of Irkutsk secondary school № 19,
Irkutsk, Russia²*

STUDY OF THE ABILITY OF BACTERIA *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* RESTORE OIL-CONTAMINATED SOIL AND DESTROY INDIVIDUAL HYDROCARBONS THAT ARE PART OF THE OIL

*The article is devoted to the actual problem of the process of biodegradation of oil by bacteria. The data obtained as a result of the research today expand the understanding of the function of rhizosphere microorganisms in the process of bioremediation of oil-contaminated soils. Research will promote to the clarification of the process of neftegastruba and extent of the participation of microorganisms biodestructors in it. The study studied the ability of *Rhodococcus erythropolis* to the destruction of hydrocarbons that are part of the oil.*

*Key words: bacteria-oil destructors, *Rhodococcus erythropolis*, bioremediation, alkanes, aromatic hydrocarbons.*

Поступила в редакцию 14 марта 2019