

ЭКОЛОГИЯ И РАЦИОНАЛЬНОЕ ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ

УДК 579.64

Скрининг бактерий, ассоциированных с растениями, по способности деструктировать компоненты нефти

М.С. Третьякова^{1 a}, Л.А. Беловежец^{2 b}, Ю.А. Маркова^{1, 3 c}

¹Институт физиологии и биохимии растений СО РАН, ул. Лермонтова 132, Иркутск, Россия

²Институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, ул. Фаворского 1, Иркутск, Россия

³Иркутский национальный исследовательский технический университет, ул. Лермонтова 83, Иркутск, Россия

^amarina-tretjakova@yandex.ru, ^blyu-sya@yandex.ru, ^cjuliam06@mail.ru

Статья поступила 20.10.2015, принята 16.11.2015

Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами является серьезной проблемой, в том числе для Иркутской области, где сосредоточены нефтедобывающие и нефтеперерабатывающие заводы. Ежегодно в результате аварий и утечек на нефтепроводах происходит попадание нефти в почву, что приводит к негативным экологическим последствиям. На сегодняшний день существуют различные методы очистки загрязненных нефтью почв, но наиболее перспективной и экологически безопасной является биоремедиация, основанная на использовании аутохтонных углеводородокисляющих микроорганизмов, адаптированных к климатическим и почвенным условиям конкретного региона. Благодаря наличию у таких микроорганизмов соответствующих ферментных систем они способны разлагать нефть и нефтепродукты до безопасных соединений. Целью нашей работы стало выделение аутохтонных эндофитных и ризосферных микроорганизмов из растений, произрастающих на нефтезагрязненных почвах, и их скрининг по способности к деструкции нефти. В результате проведенных исследований было выделено 60 ризосферных и эндофитных бактерий, потенциально способных к биодegradации нефти. Путем скрининга выявлено 6 наиболее перспективных штаммов, которые за 2 месяца культивирования утилизировали около 50 % нефти. Все они были способны расти при высоких (до 20 %) и очень высоких (50 %) концентрациях нефти в питательной среде, а также эффективно разрушали тетрадекан, дизельное топливо и сырую нефть на твердой питательной среде. Полученные результаты являются основой дальнейшего изучения и применения этих штаммов для очистки нефтезагрязненной территории Иркутского региона.

Ключевые слова: биодеструкция; нефть; углеводородокисляющие микроорганизмы.

Screening of bacteria associated with plants for the ability to destruct oil components

M.S. Tretyakova^{1 a}, L.A. Belovezhets^{2 b}, Yu.A. Markova^{1, 3 c}

¹Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 132, Lermontov St., Irkutsk, Russia

²Institute of Chemistry named after A.E. Favorsky, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 1, Favorsky St., Irkutsk, Russia

³Irkutsk State Technical University; 83, Lermontov St., Irkutsk, Russia

^amarina-tretjakova@yandex.ru, ^blyu-sya@yandex.ru, ^cjuliam06@mail.ru

Received 20.10.2015, accepted 16.11.2015

Environmental pollution with oil and oil products is currently a serious problem. The problem is most urgent in Irkutskaya oblast, where oil-producing companies and oil refineries are concentrated. Each year, as a result of accidents and leaks on the pipelines, oil penetrates into the soil. It leads to negative environmental effects. Today, there are different methods for cleaning oil-contaminated soil but the most promising and environmentally safe method is bioremediation. It is based on the use of indigenous hydrocarbon-oxidizing microorganisms adapted to the climatic and soil conditions in a particular region. Due to the enzyme systems, such microorganisms are capable of degrading oil and oil products into less toxic forms. The aim of our work is to isolate indigenous endophytic and rhizosphere microorganisms from plants growing in contaminated soils and screen their ability to oil destruction. As a result of studies 60 rhizosphere and endophytic bacteria potentially capable to biodegrade oil have been isolated. By screening, 6 of the most promising strains have been selected that have utilized approximately 50% of the oil for 2 months' cultivation. They all have been able to grow at high (up to 20%) and very high (up to 50%) concentrations of oil in the culture medium, and they have effectively destructed a tetradecane, diesel and crude oil on a solid medium. The results are the basis for further study and application of these strains for cleaning oil-contaminated areas of the Irkutsk region.

Key words: biodestruction; oil; hydrocarbons-oxidations microorganisms.

Введение. Нефть и нефтепродукты — это наиболее значимые и опасные загрязнители окружающей среды во всем мире. В России потери при добыче, транспортировке, переработке и хранении нефти составляют 8-9 млн т в год [1]. Самой уязвимой с точки зрения экологической безопасности является почва, способная аккумулировать загрязнения в больших количествах, что приводит к изменению ее физических, агрохимических, микробиологических характеристик, утрате сельскохозяйственного значения [2].

Существуют различные методы очистки нефтезагрязненных территорий. Наиболее известны физико-химические, химические, термические методы [3], но они либо приводят к вторичному загрязнению почвы, либо требуют проведения больших земельных работ и дополнительной очистки.

В настоящее время перспективным считается микробиологический метод, основанный на стимуляции роста и активности природных микроорганизмов (биостимуляция) или внесении в почву активных микроорганизмов-деструкторов (биоаугментация) [4; 5]. Однако использование микробиологических препаратов имеет ряд ограничений, связанных с тем, что микроорганизмы, не адаптированные к определенным климатическим и почвенным условиям, не способны эффективно утилизировать загрязнитель. В то же время привнесенные микроорганизмы не могут конкурировать с автохтонной микрофлорой и быстро элиминируются из экосистемы. Поэтому для каждого региона необходимо создание собственных микробных препаратов, в состав которых входят только аборигенные микроорганизмы.

В последнее время особое внимание уделяется роли эндофитных и ризосферных бактерий в биоремедиации почвы. Есть сведения, указывающие, что растения, выросшие в условиях нефтезагрязнения, селективно накапливают эндофитную микрофлору, имеющую плазмиды для утилизации нефтепродуктов [6]. Численность микроорганизмов, способных к деструкции загрязителя, в ризосфере растений существенно больше, чем вне ее [7; 8].

Целью данной работы было выделение эндофитных и ризосферных микроорганизмов из растений, произрастающих на почвах, загрязненных нефтепродуктами, и их скрининг по способности к деструкции нефти.

Методика. Объектом исследования стали культуры бактерий, выделенные из эндосферы и ризосферы растений, а также из нефтезагрязненной почвы вблизи пос. Тыреть Заларинского района Иркутской области. В марте 1993 г. там произошла авария, в результате которой на поверхность почвы вытекло примерно 14 т нефти. В месте разрыва нефтепровода были отобраны образцы почвы и пробы растений, наиболее широко представленных в районе загрязнения.

Для выделения эндосферных микроорганизмов проводили поверхностную стерилизацию растения путем обработки гипохлоритом натрия (0,7 %) в течение 10 мин [9]. Для выделения микроорганизмов из ризосферы растений 10 г корней вместе с почвой помещали в 100 мл стерильной водопроводной воды, встряхивали в течение 15 мин и готовили разведения. Затем полученные суспензии высевали в накопительную среду [10], в которую в качестве единственного источника углерода добавляли гексан, автомобильное масло, отработанное автомобильное масло и бензин. Микроорганизмы инкубировали 30 сут. при постоянном встряхивании на качалке при температуре 26 °С. Для получения чистых культур углеводородокисляющих микроорганизмов использовали агаризованную среду [11].

Для выявления наиболее активных деструкторов нефти брали 2-суточные культуры бактерий в концентрации 10^7 КОЕ / 1мл, добавляли в жидкую минеральную среду следующего состава (г/л): NH_4NO_3 — 1.0; MgCl_2 — 0.1; KH_2PO_4 — 3.0; K_2HPO_4 — 7.0; CaCO_3 — 1.0; pH 7.0, куда в качестве единственного источника углерода и энергии вносили сырую нефть в концентрации 2 % от общего объема минеральной среды. Культуры выращивали при температуре 26 °С, в темноте.

В работе использовали сырую нефть, предоставленную Ангарским нефтехимическим комбинатом (г. Ангарск) (процентное содержание С — 85 %, Н — 11,76 %, S — 0,92 %).

Первичную биodeградацию нефти в колбах оценивали по эмульсации поверхностной пленки нефти, помутнению минеральной среды, газообразованию [12; 13].

После 2-месячного культивирования определяли убыль нефти гравиметрическим методом [14]. Контролем служила стерильная питательная среда, содержащая 2 % нефти.

Культуры, показавшие максимальную активность, исследовали на способность к деструкции более высоких концентраций нефти (5, 10, 20, 50 %) и росту на твердых питательных средах, содержащих тетрадекан, дизельное топливо и западносибирскую нефть.

Заключение

Из эндосферы и ризосферы растений, произрастающих на нефтезагрязненной территории Иркутской области (пос. Тыреть), выделено 60 культур бактерий (табл. 1), из них наиболее существенную нефтеразлагающую активность показали 6 культур (табл. 2). При визуальном исследовании выяснилось, что бактерии У102, 108, 109, 90, показавшие себя наиболее эффективными деструкторами, разлагали до 50 % нефти с образованием эмульсии (рис. 1). Данный факт свидетельствует о том, что эти штаммы бактерий способны синтезировать и секретировать сурфактанты [15; 16].

Таблица 1

Характеристика культур бактерий

Номер культуры	Объект выделения
У77, 78, 81, 82, 83, 76	Эндосфера пырея (<i>Elytrigia repens</i> (L.) Nevski)
У88, 91, 92, 96, 89, 86, 90	Эндосфера осоки (<i>Carex acuta</i>)
У64	Эндосфера лапчатки (<i>Potentilla anserina</i>)
У59, 60	Эндосфера лапчатки (<i>Potentilla anserina</i>)
У74	Эндосфера лопуха (<i>Arctium lappa</i>)
У94, 97, 102, 104	Ризосфера осоки (<i>Carex hancockiana</i> Maxim.)
У98, 99, 100, 105	Ризосфера осоки (<i>Carex hancockiana</i> Maxim.)
У108, 114, 116	Ризосфера пырея (<i>Elytrigia repens</i>)
У109, 112, 106, 111	Ризосфера пырея (<i>Elytrigia repens</i>)
У120, 121, 122, 124, 130, 132, 133, 137, 138, 131	Почва
У129, 139	Почва

Таблица 2

Биотрансформация нефти в жидкой минеральной среде бактериями, ассоциированными с растениями

	Убыль нефти, масс. %	Бактерии
Слаборазрушающие	5–10	У59, 111
	15–20	У83, 91, 129, 120, 133, 77, 78, 104, 136, 131, 89, 74, 116, 106, 140, 141, 142
Среднеразрушающие	20–30	У98, 99, 100, 121, 124, 130, 132, 82, 11, 139
	30–35	У81, 88, 92, 94, 96, 97, 105, 122, 76, 137, 60, 86
Сильноразрушающие	40–45	У102, 109, 138, 64
	45–54	У108, 112, 114, 90

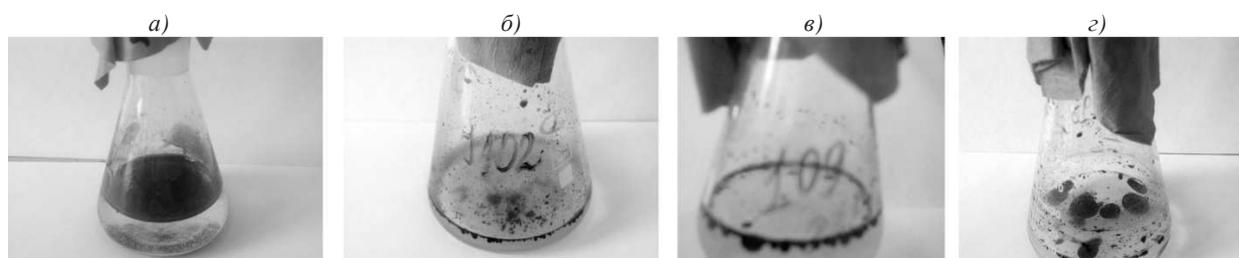


Рис. 1. Дegradация углеводородов нефти в жидкой минеральной среде: а) контроль (нефть); добавление в среду б) У102; в) У109, з) У108

Убыль нефти при культивировании штаммов У112 и 114 составляла 50 и 54 % соответственно. При этом не происходило эмульгирование нефти, но наблюдалось истончение нефтяной пленки, ее обесцвечивание. Культуральная жидкость становилась мутной за счет увеличения биомассы бактерий, отмечалось выраженное газообразование (рис. 2). При экстракции отмечено, что часть вещества не растворялась ни в водной фазе, ни в гексане, образуя соломенно-желтую желеобразную субстанцию. Мы считаем, что в данном случае происходит преимущественное разложение ароматической составляющей нефти.

Таким образом, культуры бактерий утилизировали нефть с разной эффективностью. Наибольшую деградирующую способность показали штаммы У102, 108, 109, 112, 114, 90, которые будут использованы нами для дальнейших экспериментов.



Рис. 2. Образование газов штаммом У112 при разложении сырой нефти

Отобранные штаммы также были проверены на способность выживать при высокой концентрации нефти. Показано, что все штаммы успешно росли при высоком (20 %) и экстремально высоком (50 %) содержании нефти в питательной среде, а штамм 114 смог утилизировать 10 % нефти даже при таком уровне нефтезагрязнения (табл. 3).

Определение способности выбранных культур де-структурировать углеводороды нефти на твердой минеральной среде (тетрадекан, дизельное топливо, нефть) показало активный рост всех исследованных штаммов как на тетрадекане, так и на дизельном топливе. При добавлении 10 % нефти способными к росту оказались только 112-й и 114-й штаммы (табл. 4).

Таблица 3

Разложение нефти бактериями при разной концентрации

Концентрация нефти, %	Штамм					
	90	102	108	109	112	114
5	25	22	30	24	35	32
10	15	13	11	12	28	23
15	12	10	10	10	24	22
20	9	7	7	8	16	18
50	5	4	5	6	8	10

Таблица 4

Рост бактерий

Штамм	Тетрадекан, %					Дизельное топливо, %					Нефть, %				
	1	2,5	5	7,5	10	1	2,5	5	7,5	10	1	2,5	5	7,5	10
112	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
114	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
108	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	-
109	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
102	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
90	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Примечание. Наличие активного роста: ++, наличие роста: +, отсутствие роста: -.

В результате проведенных исследований было выделено 60 ризосферных и эндофитных бактерий, потенциально способных к биодegradации нефти. Путем скрининга выявлено 6 наиболее перспективных штаммов, которые за 2 месяца культивирования утилизировали около 50 % нефти. Все они были способны расти при высоких (до 20 %) и очень высоких (50 %) концентрациях нефти в питательной среде. Наиболее активным нефтедеструктором оказался штамм 114, который не только деградировал 10 % нефти при ее содержании 50 %, но и эффективно разрушал тетрадекан, дизельное топливо и сырую нефть на твердой питательной среде.

Работа поддержана грантом
РФФИ № 14-44-04094 p_сибирь_a.

Литература

1. Нечаева И.А., Филонов А.Е., Ахметов Л.И., Пунтус И.Ф., Боронин А.М. Стимуляция микробной деструкции нефти в почве путем внесения бактериальной ассоциации и минерального удобрения в лабораторных и полевых условиях // Биотехнология. 2009. № 1. 64-70 с.
2. Киреева Н.А. Биодеструкция нефти в почве культурами углеводородоокисляющих микроорганизмов // Биотехнология. 1996. №1. 51-54 с.
3. Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем / под ред. М.А. Глазговской. М.: Наука, 1988. 264 с.
4. Коронелли Т.В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводородов в окружающей среде // Прикладная биохимия и микробиология. 1996. Т. 32, № 6. С. 579-585.
5. Вельков В.В. Биоремедиация; принципы, проблемы, подходы // Биотехнология. 1995. № 3-4. 20 с.

6. Siciliano S.D. Selection of Specific Endophytic Bacterial Genotypes by Plants in Response to Soil Contamination. 2001. Appl. Environ. Microbiol. 2001. Vol. 66. P. 4673-4678.
7. Binet P., Portal J.M., Leyval C. Dissipation of 3±6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass // Soil Biology & Biochemistry. 2000. Vol. 32. P. 2011-2017.
8. Banks M.K., Schwab P., Liu B. The Effect of Plants on the Degradation and Toxicity of Petroleum Contaminants in Soil: A Field Assessment // Advances in Biochemical Engineering & Biotechnology. 2003. Vol. 78. P. 75-96.
9. Маркова Ю.А. Полигостальность условно-патогенных энтеробактерий на модели их взаимодействия с растениями: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Иркутск, 2013. 25 с.
10. Хабибуллина Ф.М., Шубаков А.А., Арчегова И.Б., Романов Г.Г. Исследование способности нефтеокисляющих бактерий утилизировать углеводороды нефти // Биотехнология. 2002. № 6. С. 57-62.
11. Чугунов В.А., Ермоленко З.М., Жиглецова С.К., Мартовцевая И.И. Создание и применение жидкого препарата на основе ассоциации нефтеокисляющих бактерий // Прикладная биохимия и микробиология. 2000. Т. 36, № 6. С. 666-671.
12. Белоусова Н.И., Барышникова Л.М., Шкидченко А.Н. Отбор микроорганизмов, способных к деструкции нефти и нефтепродуктов при пониженной температуре // Прикладная биохимия и микробиология. 2002. Т. 38, № 5. С. 513-517.
13. Грищенко В.Г., Гаязов Р.Р., Токарев В.Г. Бактериальные штаммы-деструкторы топочного мазута: характер дегградации в лабораторных условиях // Прикладная биохимия и микробиология. 1997. Т. 33, № 4. С. 423-427.
14. Другов Ю.С., Родин А.А. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов: практ. руководство. 2-е изд. перераб. и доп. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. 270 с.
15. Makkar R.S., Cameotra S.S. Ann update on the USA of Unconventional Substance for biosurfactant proction and their new application// Applied Microbiology Biotechnology. 2002. Vol. 58. P. 428-434.

16. Kitamoto D., Isoda H. Review of functions of glycolipids biosurfactants // Journal of Biotechnology. 2002. Vol. 3. P.187-201.

Reference

1. Nechaeva I.A., Filonov A.E., Akhmetov L.I., Puntus I.F., Boronin A.M. Stimulation of microbial destruction of oil by introduction of bacteria association and mineral fertilizer in soil under laboratory and field conditions // Russian Journal of Biotechnology. 2009. № 1. 64-70 p.

2. Kireeva N.A. Biodegradation of petroleum in the soil cultures hydrocarbons oxidizing microorganisms // Russian Journal of Biotechnology. 1996. № 1. 51-54 p.

3. Restoration of contaminated soil ecosystems / pod red. M.A. Glazovskoi. M.: Nauka, 1988. 264 p.

4. Koronelli T.V. Principles and methods for Raising Efficiency of Biological degradation of hydrocarbons in the environment // Applied Biochemistry and Microbiology. 1996. T. 32, № 6. P. 579-585.

5. Vel'kov V.V. Bioremediation: Principles, problems, approaches // Russian Journal of Biotechnology. 1995. № 3-4. 20 p.

6. Siciliano S.D. Selection of Specific Endophytic Bacterial Genotypes by Plants in Response to Soil Contamination. 2001. Appl. Environ. Microbiol. 2001. Vol. 66. P. 4673-4678.

7. Binet P., Portal J.M., Leyval C. Dissipation of 3±6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass // Soil Biology & Biochemistry. 2000. Vol. 32. P. 2011-2017.

8. Banks M.K., Schwab P., Liu B. The Effect of Plants on the Degradation and Toxicity of Petroleum Contaminants in Soil: A Field Assessment // Advances in Biochemical Engineering & Biotechnology. 2003. Vol. 78. P. 75-96.

9. Markova Yu.A. Polyhostality opportunistic enterobacteria on the model of their interaction with plants: avtoref. dis. ... d-ra biol. nauk. Irkutsk, 2013. 25 p.

10. Khabibullina F.M., Shubakov A.A., Arhegova I.B., Romanov G.G. The study of the capacity of oil oxidizing bacteria of utilizing oil hydrocarbons // Russian Journal of Biotechnology. 2002. № 6. P. 57-62.

11. Chugunov V.A., Ermolenko Z.M., Zhigletsova S.K., Martovetskaya I.I. Creation and application of a liquid formulation based on oil-oxidizing bacteria association // Applied Biochemistry and Microbiology. 2000. T. 36, № 6. P. 666-671.

12. Belousova N.L., Baryshnikova L.M., Shkidchenko A.N. Selection of Microorganisms capable of degrading petroleum and Its Products at Low temperatures // Applied Biochemistry and Microbiology. 2002. T. 38, № 5. P. 513-517.

13. Grishchenkov V.G., Gayazov R.R., Tokarev V.G. Bacterial strains-destroyers of heating oil: the nature of the degradation in laboratory conditions // Applied Biochemistry and Microbiology. 1997. T. 33, № 4. P. 423-427.

14. Drugov Yu.S., Rodin A.A. Environmental analyses for strait of petroleum and petroleum products: prakt. rukovodstvo. 2-e izd. pererab. i dop. M.: BINOM. Laboratoriya znaniy, 2014. 270 p.

15. Makkar R.S., Cameotra S.S. Ann update on the USA of Unconventional Substance for biosurfactant proction and their new application// Applied Microbiology Biotechnology. 2002. Vol. 58. P. 428-434.

16. Kitamoto D., Isoda H. Review of functions of glycolipids biosurfactants // Journal of Biotechnology. 2002. Vol. 3. P. 187-201.

УДК 346.2, 347.454, 630*23, 630*68

Лесная биржа как способ решения проблем лесного комплекса Российской Федерации

А.Л. Гребенюк^{1 а}, М.А. Гребенюк^{2 б}

¹Братский государственный университет, ул. Макаренко 40, Братск, Россия

²Байкальский государственный университет экономики и права, ул. Ленина 11, Иркутск, Россия

^аas17vl@list.ru, ^бmagnit333@list.ru

Статья поступила 25.09.2015, принята 5.11.2015

Вследствие проблем, присущих лесу как экологической системе, природному ресурсу и экономическому товару, сложившаяся система организации управления лесным комплексом Российской Федерации нуждается в модернизации. Наиболее серьезные и комплексные проблемы — это незаконные рубки лесных насаждений и неэффективное лесовосстановление. Выявленные причины возникновения и распространения этих проблем свидетельствуют об отсутствии нормативных и организационных механизмов, способных их решить и устранить. В результате государство теряет доход от пользования лесом, страдает качество лесовосстановительных мероприятий и ухудшается качественный состав леса. Попыткой решения названных проблем стало создание лесной биржи в Иркутской области. Несмотря на значительную эффективность деятельности, достигнуты не все цели, для достижения которых лесная биржа была создана. Одной из таких является незаконный оборот леса. В целях искоренения этой, а также некоторых других проблем отечественного лесного комплекса изложена новая схема организации оборота леса, центральное место в которой отведено лесной бирже. Предложенная модель обосновывает необходимость замены договора аренды лесного участка на договор подряда для государственных нужд, а также условное разделение по профилю частных организаций, функционирующих в лесной отрасли. Схема имеет экономическое, экологическое и социальное обоснование и может быть реализована как на территории Российской Федерации в целом, так и в ее отдельных субъектах.

Ключевые слова: лесная биржа; лесовосстановление; незаконные рубки лесных насаждений; договор аренды лесных участков.