

Динамика микробиоценоза гетеротрофов в модельных опытах с применением биосорбента на основе смешанной бактериальной культуры

О.С. Федорова^a, Т.В. Рязанова^b

Сибирский государственный аэрокосмический университет имени М.Ф. Решетнева, пр. Мира 82, Красноярск, Россия

^aoc-57@mail.ru, ^btatyana-htd09@mail.ru

Статья поступила 27.01.2017, принята 16.02.2017

*Исследовано воздействие ферментного комплекса смешанной культуры нефтеокисляющих штаммов бактерий *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Nocardioideis albus* на динамику гетеротрофов в условиях модельного почвенного эксперимента с содержанием углеводородов сырой нефти 10 и 20 % в присутствии полимерного карбамидного сорбента, минеральных добавок и измельченной коры березы в разных вариантах. Установлено, что гетеротрофное сообщество нефтезагрязненной почвы при внесении иммобилизованной на сорбенте биомассы существенно возрастает и за первые шесть недель суммарно достигает значения титра в пределах 10^6 – 10^7 , в зависимости от дополнительного внесения компонентов, что коррелирует с процессом снижения концентрации нефти. Оценка и сравнение процесса биодеструкции *in vitro* показали, что за восемь недель снижение количества углеводородов составило 90–94 % от внесенного, максимальный суммарный титр установлен на шестой неделе при 10%-ном загрязнении $8,1 \cdot 10^7$ с последующим падением на два порядка; в условиях 20%-ного загрязнения процесс прошел медленнее, но максимальный титр гетеротрофов составил 10^6 и превышал контроль без обработки (10^2). Определяющим оказался и температурный фактор, так как при прочих равных условиях при 14–15 °C биодеструкция и динамика гетеротрофов на сниженной концентрации немного опережала вариант с удвоенной концентрацией нефти, но при температуре 22–24 °C. С учетом создания благоприятной питательной среды соотношения биогенных элементов и влияния воздействия температуры, доступности кислорода и достаточной влажности применение исследуемых культур для ферментативной деградации углеводородного загрязнителя может быть перспективным в практическом отношении в виде смешанной культуры. Показано, что внесение полученной в жидкофазном процессе биомассы нефтеокисляющих микроорганизмов может быть эффективным и позволит ликвидировать загрязнения высоких концентрациях в течение одного вегетационного периода.*

Ключевые слова: биодеструкция углеводородов; нефтеокисляющие штаммы *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Nocardioideis albus*; иммобилизация; гетеротрофы почвы.

Dynamics of heterotrophs microbiocenosis in model experiments with application of biosorbent on basis of mixed bacterial culture

O.S. Fedorova^a, T.V. Ryzanova^b

Siberian State Aerospace University named after M.F. Reshetnev, 82, Mira pr., Krasnoyarsk, Russia

^aoc-57@mail.ru, ^btatyana-htd09@mail.ru

Received 27.01.2017, accepted 16.02.2017

*The impact of a fermental complex of a mixed culture of oil-oxidizing strains of bacteria of *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Nocardioideis albus* on dynamics of heterotrophs in the conditions of a model soil experiment with the content of hydrocarbons of crude oil 10 and 20 of % in the presence of a polymeric carbamide sorbent, mineral additives and crushed birch bark in different options is investigated. It is established that the heterotrophic community of oil-contaminated soil at the introduction of immobilized on a sorbent biomass significantly increases. Depending on the additional introduction of the components, it totally reaches the value of a caption within 10^6 – 10^7 for the first six weeks. This correlates with the process of decrease in the concentration of oil. The assessment and comparison of biodestruction process *in vitro* showed that in eight weeks the decrease in the amount of hydrocarbons made 90–94% from the original one. The maximum total caption was established on the sixth week at 10% pollution $8,1 \cdot 10^7$ with the subsequent falling on two orders. In the conditions of 20% of pollution the process went more slowly, but the maximum caption of heterotrophs made 10^6 and exceeded control without processing (10^2). The temperature factor was also determining as with other conditions being equal, at 14–15 °C biodestruction and dynamics of heterotrophs on the reduced concentration of hydrocarbons surpassed a little the amount with doubled concentration of oil at the temperature of 22–24 °C. Taking into account the creation of a favorable nutrient medium, a ratio of biogenic elements and temperature impact, availability of oxygen and sufficient humidity, the application of the studied cultures for fermental degradation of a hydrocarbonic pollutant can be perspective in practice in the form of a mixed culture. It is shown that the introduction of oil-oxidizing microorganisms biomass, received in a liquid-phase process, is effective and allows to liquidate a highly-concentrated pollution within one vegetative period.*

Key words: biodestruction of hydrocarbons; oil-oxidizing strains of *Bacillus subtilis*; *Bacillus cereus*; *Nocardioideis albus*; immobilization; soil heterotrophs.

Введение

Одним из важнейших факторов антропогенного воздействия на природу остается загрязнение нефтью и продуктами ее переработки. Для этого процесса характерны стойкие изменения среды, сопровождающиеся комплексом реакций биоценоза на микробиологическом и фитологическом уровне. Основой восстановительных процессов нарушенных розливом нефти территорий является ферментативная активность углеводородокисляющей микрофлоры, которая всегда присутствует в почве, но при массивном загрязнении находится в угнетенном состоянии. Утечки нефти в больших количествах усугубляют проблему и делают процесс самовосстановления невозможным. Угнетение микробиоценоза в целом возникает не столько из-за токсичности компонентов нефти, сколько по причине резкого изменения физико-химических характеристик почвы: отсутствия воды и кислорода, образования битумной пленки после испарения легких фракций, высокой концентрации углеводных компонентов при недостатке источников азота и фосфора [1; 2]. Нефть — это жидкий природный раствор, состоящий из большого количества углеводородов разнообразного строения и высокомолекулярных смолисто-асфальтеновых веществ, в котором растворено некоторое количество воды, солей и микроэлементов.

В составе нефти идентифицировано около тысячи различных соединений, и отдельные месторождения характеризуются специфичностью. Элементный состав углеводородов может изменяться в пределах 4 % [1].

Общая токсичность нефти, как правило, невысока. В то же время, отдельные компоненты нефти и продуктов ее биоразложения, преимущественно полиароматические и полициклические соединения, отличаются мутагенностью и канцерогенными свойствами, последствия их воздействия на живые организмы, в том числе и на человека, могут проявляться через многие годы и в последующих поколениях.

Экологические проблемы, вызванные загрязнением территорий и акваторий нефтью, неизбежно происходят из-за технических нарушений, несоблюдения регламентов, бесхозяйственности и применения стандартных приемов освоения территорий без учета природно-климатической обстановки региона. Плодородный слой почвы представляет собой сложную саморегулирующую систему, органоминеральный комплекс, требующий для поддержания своего существования конкретных условий. При загрязнении происходит изменение морфологических, физико-химических, биологических свойств биоценоза, что имеет последствия, приводящие к угнетению, деградации или полной гибели растительности. Степень повреждения прямо пропорциональна количеству вылитой нефти и зависит от видового разнообразия живых организмов.

Происходит резкое падение биомассы мезофауны, уменьшается мощность обитаемого слоя почвы, затрудняется и даже прекращается ее обогащение кислородом, что существенно ограничивает существование аэробной микрофлоры, а в связи с этим прекращается и образование в почве необходимых для растений питательных веществ.

Специфическое воздействие нефти на живые системы может классифицироваться как прямая летальная токсичность на уровне клеточных и мембранных процессов, вызывающая сублетальные нарушения физиологической активности, приводящие к нарушениям функций питания и размножения за счет прямого обволакивающего воздействия, включения вредных веществ в ткани, концентрирования и передачи полициклических ароматических углеводородов по пищевым цепям, изменения среды обитания, что приводит к сужению видового состава биоценоза [2].

Нефть, содержащая много легких фракций, окисляется на поверхности почв, особенно тяжелого механического состава, за счет фотохимических реакций. Проникновение нефти по профилю почв — медленное и сопровождается резким фракционированием ее состава: в верхних горизонтах сорбируются высокомолекулярные фракции, особенно смолы и асфальтены. Твердый парафин не токсичен для живых организмов, но он может надолго запечатать все поры почвенного покрова, лишая почву свободного влагообмена и дыхания. В нижние горизонты и грунтовые воды по трещинам и ходам корней проникают низкомолекулярные соединения, растворимые в воде, и там, в анаэробных условиях, они могут сохраняться длительное время, что неизбежно ведет к снижению или полной утрате почвенного плодородия или нативного биоценоза.

Оценивая последствия, трудно сказать, сможет ли система самовосстановиться, но при разработке мер по ликвидации последствий необходимо исходить из главного принципа — не нанести природе еще больший ущерб, чем тот, что уже нанесен. Суть этого принципа заключается в максимальной мобилизации внутренних ресурсов экосистемы с помощью рекультивации и применения комплекса мер естественно-биологической направленности [4].

Существующие методы ликвидации загрязнений физико-химической направленности не решают проблему полностью, а зачастую наносят биоценозам еще больший ущерб за счет образования новых, не свойственных природным условиям соединений, часто токсического или канцерогенного характера (в частности, при выжигании нефтяных разливов в больших количествах образуется бензапирен), нарушения структуры почв при съеме и перемещениях грунта.

Механизм самовосстановления биоценоза после нефтяного загрязнения достаточно сложен и занимает много времени (более 10–25 лет). Решающая роль в этом процессе принадлежит микроорганизмам, способным в многоступенчатом ферментативном процессе использовать загрязняющие вещества в качестве источника углерода и энергии. Но природные процессы происходят в нерегулируемых условиях среды, при влиянии ингибирующих и лимитирующих факторов, ограничивающих рост и размножение биомассы клеток.

Сокращение этого периода восстановления достигается благодаря применению системы биологической рекультивации, связанной с созданием благоприятных условий среды: достаточной влажности, обеспечения доступа кислорода при структурировании и рыхлении почвы, выравнивания соотношения биогенных элементов путем внесением удобрений, нейтрализации.

Методы, применяемые для рекультивации, весьма разнообразны, накоплен определенный опыт применения технологий с разными вариантами обработки. Но в любом случае, завершающий этап нейтрализации разлива углеводородов характеризуется деятельностью специализированной углеводородоокисляющей микрофлоры. После локализации разлива и сбора избыточной нефти специальными устройствами возможны два варианта обработки территории: активация собственной аборигенной микрофлоры почвы либо внесение специализированных биопрепаратов в жидкой или сухой форме [11–13].

Необходимость применения биопрепаратов при современных темпах освоения природных ресурсов и нефтедобычи очевидна, поэтому их распространение увеличивается не только за рубежом, но и в нашей стране. Применение методов биотехнологии позволяет обеспечить экологическую безопасность этих процессов и одновременно снизить материальные и трудовые затраты на восстановление биоценозов. По сравнению с другими методами, биоремедиация *in situ* более автономна и дешева, но чувствительна к условиям среды. При рассеянном загрязнении с низкими концентрациями углеводородов она незаменима, и большинство существующих биопрепаратов эффективны только при невысоких концентрациях загрязнителя.

Биологические методы ликвидации углеродных загрязнений основаны на метаболическом потенциале нефтеокисляющих микроорганизмов. Только деятельность микробиоценоза позволяет полностью ликвидировать загрязнение, но использование специализированной биомассы требует адаптации смешанных культур к конкретным объектам и задачам биоремедиации.

Специфическим методом изменения свойств клеток является адсорбция, которая вызывает интенсификацию метаболической активности и устойчивости к факторам внешней среды.

Использование иммобилизованных клеток биомассы нефтеокислителей *in vitro* — перспективная альтернатива традиционным методам, основанным на внесении свободных клеток.

Нефтезагрязненная почва есть естественная иммобилизованная система с особым распределением клеток по поверхностям минеральных частиц и компонентов органического происхождения, а также по поверхности адсорбированного загрязнителя.

Несомненными преимуществами здесь обладают биосорбенты, оказывающие комбинированное воздействие — сорбция нефти с последующей микробиологической деструкцией углеводородов, без затрат на сбор и утилизацию после применения, — способные работать в значительных концентрациях загрязнителя. В почве восстанавливается количество и расширяется многообразие микробного сообщества гетеротрофов, так как окисление углеводородов заканчивается обычным гетеротрофным метаболизмом и приводит к нарастанию массы клеток и обогащению органическими веществами биогенного происхождения.

Так как существующие в настоящее время бактериальные биопрепараты эффективны при низких концентрациях нефти, существует потребность в создании консорциумов, работающих в условиях сильных за-

грязнений. Известно, что монокультуры более специфичны по отношению к индивидуальным углеводородам, концентрациям, интервалам активности по pH солености и температуре. Полибактериальные препараты имеют более широкие адаптационные экологические свойства и возможности для расширения спектра окисляемых углеводородов. Но в любом случае, для каждого биопрепарата, учитывая его состав, требуется подбор условий получения, формы и сроков хранения, активации и внесения.

Для увеличения скорости биовосстановления применяют биомассу специально выделенных и адаптированных к высоким концентрациям загрязнителя штаммов, ферментативно активных к углеводородам и выращенных в глубинном аэробном жидкофазном процессе.

Одним из направлений использования может быть применение иммобилизации суспензии на полимерном пористом сорбенте [7; 8].

Применение адсорбированных микроорганизмов имеет преимущества, связанные с фиксацией клеток в нефтезагрязненном слое почвы. Тем самым решается проблема вымывания клеток биодеструкторов из зоны биоремедиации током влаги, что увеличивает эффективность биодеструкции. Определенные преимущества в этом случае имеют биосорбенты комбинированного действия. Благодаря высокопористой структуре, полученной из отвержденной пены на основе смеси органических и неорганических веществ, сорбент обладает высокой нефтеемкостью и достаточной прочностью. В то же время, он может быть механическим носителем для микроорганизмов с одной стороны, а с другой — его компоненты создают благоприятное соотношение биогенов в системе «углерод : азот : фосфор» и используются клетками в процессе метаболизма, ускоряя окисление компонентов загрязнителя.

На кафедре химической технологии древесины и биотехнологии СибГТУ создана коллекция аборигенных нефтеокислителей, бактерий и актиномицетов, устойчивых к высоким концентрациям нефти и адаптированных к сорбенту.

Целью настоящей работы является оценка влияния биосорбента и способа дополнительной обработки на микробиоценоз почвы с высоким уровнем загрязнения в условиях эксперимента *in vitro*.

Применение биосорбента позволяет осуществлять одновременно сбор и удержание нефти, локализацию разлива и биоокисление углеводородов *in situ*, на месте, с использованием ферментативных возможностей микроорганизмов. Для конкретных случаев следует принимать свое решение относительно выбора культур и концентраций для достижения планируемого эффекта, учитывая почвенные, климатические условия, а также состав нефти и возраст разлива [9].

Эксперимент. Исследование количественных показателей процесса биодеструкции и определение скорости разложения углеводородов под действием штаммов *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Nocardioides albus* и *Candida Scottii* проводили в лабораторных условиях, посредством моделирования условий нефтяного загрязнения на почве. Первые три культуры в соотноше-

нии 1:1:1 использованы во всех опытах. Культура *C. scottii* добавлена только во втором варианте.

Эксперимент вели в пластиковых контейнерах, при температуре 27 °С. Навески нестерильной почвы (200 г) помещали в контейнеры, увлажняли до 60 %, наносили 10 и 20 % (об.) нефти в разных вариантах обработки ($\rho = 0,804 \text{ г/см}^3$). Полученную массу перемешивали до однородности, вносили дополнительные органические материалы, кору и удобрение, гранулированный сорбент. На сорбент наносили суспензию микроорганизмов, по ходу процесса каждую неделю вели рыхление и увлажнение. Длительность эксперимента

— двенадцать недель. Варианты обработки представлены в табл. 1.

Анализ микробного сообщества гетеротрофов проб проводили методом десятикратных разведений с высевом на соответствующие плотные питательные среды через каждые две недели. Для анализа растирали в ступке 1 г почвы, затем помещали в колбу с 99 мл стерильной воды и 30 мин взбалтывали на круговой качалке. После оседания почвенных частиц делали серийные десятикратные разведения и посев на чашки Петри в двух повторностях. Параллельно определяли влажность. Посевы инкубировали при 24 °С в течение трех суток.

Таблица 1

Варианты обработки почвы

| Варианты | Бактериальная культура по 3,5 мл | Вариант внесения компонентов, г | Сорбент | Концентрация нефти, % |
|----------|---|---------------------------------|----------------|------------------------------|
| № 1 | <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Nocardioides albus</i> , <i>Candida Scottii</i> | кора березы, 1 | «Унисорб», 2 г | 10 % — 20 мл |
| № 2 | | удобрение (диаммофос), 0,5 | | 10 % — 20 мл |
| № 3 | | кора 1, удобрение 0,5 | | 10 % — 20 мл |
| № 4 | | кора, 1 | | 20 % — 40 мл |
| № 5 | | удобрение (диаммофос), 0,5 | | 20 % — 40 мл |
| № 6 | | кора 1, удобрение 0,5 | | 20 % — 40 мл |
| Контроль | — | — | — | 10 % — 20 мл 20 % — 40 мл |

В качестве среды для выделения гетеротрофов использовали агар по Мишустину (БСА), для грибных культур — среду Чапека, для коринебактерий и актиномицетов — почвенный агар Локхиды. Подсчет титра клеток вели с учетом разведений и влажности. Степень биодеструкции внесенной нефти определяли гравиметрически.

Обсуждение результатов. Изменение количества микроорганизмов — это реакция микробиоценоза на колебания внешних условий и присутствие загрязнителя. На рис. 1 представлена динамика изменения численности гетеротрофных микроорганизмов, способных расти на среде БСА (агар по Мишустину), в чистой, нефтезагрязненной и подвергнутой биообработке почве.

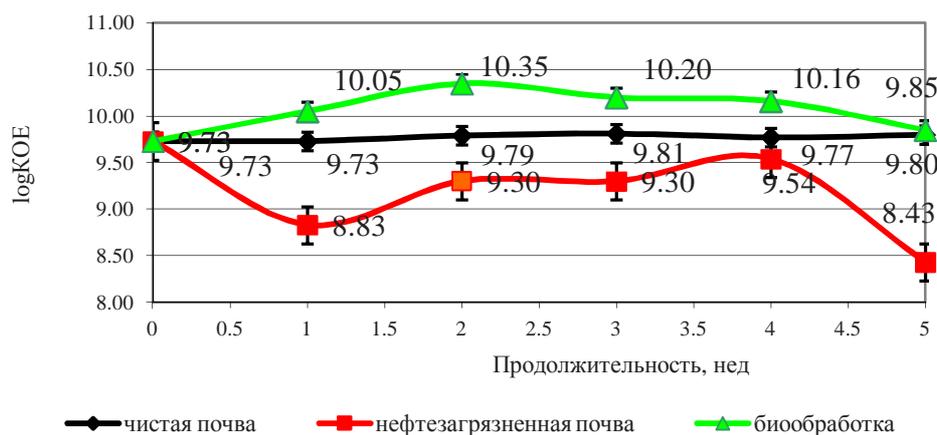


Рис. 1. Динамика численности гетеротрофных микроорганизмов

Результаты учета гетеротрофов за первые четыре недели показали, что количество микроорганизмов в чистой почве остается на одном уровне. При нефтезагрязнении количество гетеротрофов сразу резко снижается в течение первой недели. После удаления легких и летучих веществ нефти ее токсичность снизилась, возросло количество гетеротрофных форм. И лишь к кон-

цу четвертой недели число клеток достигает начального значения, а затем снова кратковременно падает. К концу восьмой недели титр гетеротрофов растет, возможно, за счет групп, способных использовать в своем метаболизме продукты жизнедеятельности первой сукцессии, но процесс лимитируют оставшиеся в почве тяжелые фракции нефти (рис. 2).

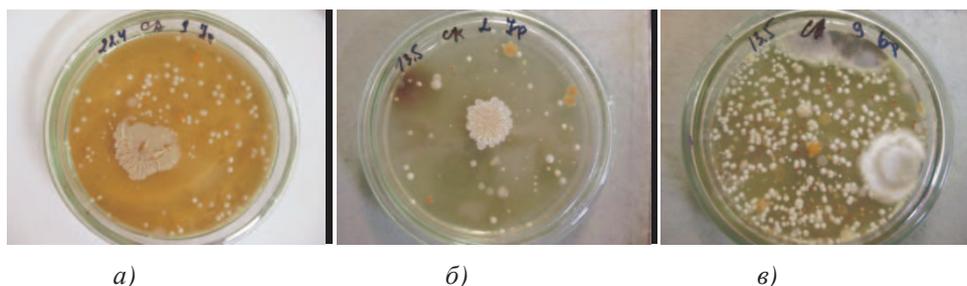


Рис. 2. Колонии клеток на среде БСА: а — чистая почва; б — нефтезагрязненная почва; г — почва с биообработкой

Внесение полимерного карбамидного сорбента с иммобилизованными клетками позволяет сразу увеличить количество гетеротрофов в почве. В течение четырех недель количество гетеротрофных микроорганизмов остается практически на одном, довольно высоком уровне.

Изучение комплекса микромицетов почвы проводили на агаризованной среде Чапека. Оценивалось общее количество колоний, способных расти на данной среде (рис. 3), без определения структуры и видового разнообразия комплекса микромицетов. Результаты показали, что в течение четырех недель количество микромицетов в чистой почве остается на одном уровне. Внесе-

ние нефти способствует резкому увеличению содержания данной группы микроорганизмов.

Известно, что микроскопические грибы способны использовать углеводороды нефти (*Aspergillus sp.*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*). Споровые культуры грибов более устойчивы к нефтезагрязнениям, чем бактериальные, что способствует увеличению количества клеток в почве при внесении источника углерода. В силу ограниченности жизненного пространства микроорганизмов лабораторные условия не могут в полной мере отразить истинные процессы, происходящие *in situ*, но позволяют дать характеристику по основным группам микробного ценоза.

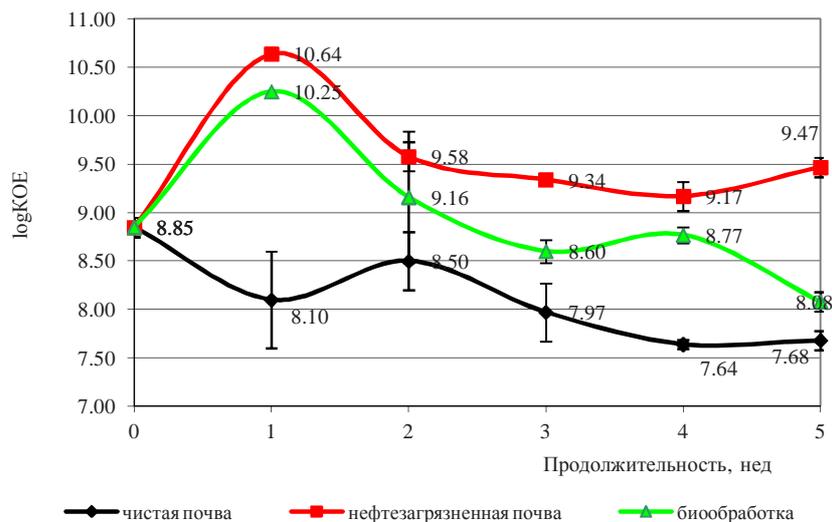


Рис. 3. Динамика численности микромицетов

Высокая концентрация нефтезагрязнений подавляет рост гетеротрофных микроорганизмов и активизирует рост более устойчивых форм — грибных и коринеподобных культур. Без внешнего воздействия процесс восстановления естественного микробного фона почвы происходит очень медленно. Внесение биомассы нефтеокислителей позволяет существенно сократить время ремедиации почвы и значительно разнообразить микробиоценоз. Результаты показали, что вариант, где помимо сорбента и микроорганизмов внесены кора и удобрение (табл. 1), является самым эффективным (рис. 4).

Это подтверждается высоким титром КОЕ гетеротрофов и хорошей биодеструкцией — до 4,04 % в остатке нефти в варианте № 3. Другие варианты с внесением микроорганизмов на сорбенте показали результат по убыли нефти в пределах 93–95 %.

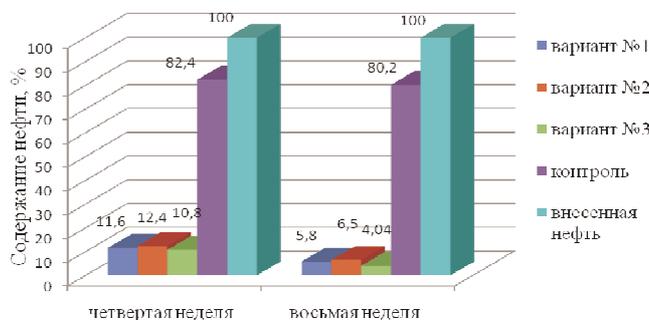


Рис. 4. Влияние смешанной культуры и продолжительности на содержание остаточной нефти при 10%-ном начальном загрязнении

В контроле убыль нефти за четыре и восемь недель составила 18–20 % за счет самоиспарения и деятельности микроорганизмов нестерильной почвы.

Исходя из опыта предыдущих исследований [8], были созданы максимально благоприятные условия для нефтеокисляющей микрофлоры с варьированием внесения дополнительных компонентов.

Известно, что в условиях нестерильной почвы интродуцированная (внесенная искусственно) биомасса нефтедеструкторов не всегда сохраняет активность и без создания благоприятного соотношения факторов среды быстро теряет преимущество и отмирает.

Результаты количественного определения гетеротрофов представлены в табл. 2.

Таблица 2

Содержание гетеротрофных микроорганизмов в почве (10 %)

| Длительность, неделя | Содержание микроорганизмов в почве, титр КОЕ кл/мл $\cdot 10^6$ | | | |
|----------------------|---|----------------------------------|---|----------|
| | вариант № 1 (сорбент, кора) | вариант № 2 (сорбент, удобрение) | вариант № 3 (сорбент, кора и удобрение) | контроль |
| 4 | 0,80 | 2,0 | 7,4 | 0,0010 |
| 6 | 54 | 39 | 81 | 0,0110 |
| 8 | 13 | 1,8 | 39 | 0,0150 |
| 10 | 1,70 | 0,2 | 1,4 | 0,0063 |
| 12 | 0,07 | 3,8 | 0,8 | 0,0060 |

Для модельного опыта использовали сорбент с иммобилизованной, максимально адаптированной к углеводородам микрофлорой, культивирование которой проводили на минеральной среде, где источником углерода была нефть. В итоге это оказало положительное влияние на состояние микрофлоры загрязненной почвы.

Остаточное содержание нефти здесь составило 10,8 %. Максимальный титр достигнут на шестой неделе, а убыль массы загрязнителя к концу восьмой недели во всех вариантах составила 90–93 %.

В варианте № 3, при создании максимально благоприятных условий питания и микроокружения для ак-

тивации гетеротрофного сообщества, по сравнению с контролем биодеструкция выше на 70–75 %.

В случае с 20%-ным содержанием нефти убыль массы за восемь недель составила в лучшем варианте (кора + удобрение + сорбент) 69,9 % (рис. 5).

Такой высокий уровень загрязнения приводит к максимальному подавлению микробиоценоза, скорость биодegradации остается низкой. Но внесение сорбента, минеральных компонентов, регулярное рыхление и увлажнение приводят к постепенному нарастанию процесса degradation загрязнителя и повышению активности гетеротрофного сообщества.

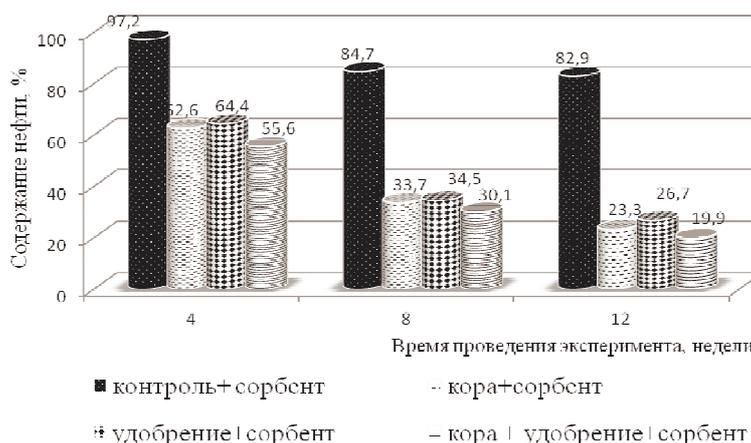


Рис. 5. Количество нефти после деструкции 20%-ного загрязнения смешанной культурой в разных вариантах

Титр гетеротрофов (рис. 6) для 20%-ного загрязнения снижен на четыре порядка. Несмотря на равные внешние условия, превышение концентрации нефти ингибирует развитие смешанной культуры и титр остается в пределах 10^6 в ходе всего процесса. Однако при сравнении второй и восьмой недели заметен суммарный рост, составивший $6,9 \cdot 10^6$, что является высоким результатом для такого загрязнения.

Концентрация гетеротрофов и убыль массы загрязнителя коррелируют в образцах при исследуемых условиях. Очевидно, что нефть как основной источник углерода и энергии в сочетании с качественным составом других компонентов успешно преобразована ферментативно в биомассу клеток, что в условиях *in situ* сказывается на восстановлении растительности и биоценоза в целом. Оценка и сравнение показателей титра в динамике с количеством углеводов позволяет утверждать, что исследуемый метод обработки нефтезагряз-

ненных почв является перспективным и позволяет не только в короткие сроки провести очистку территорий,

но и расширить микробиоценоз гетеротрофов за счет конверсии органических компонентов.

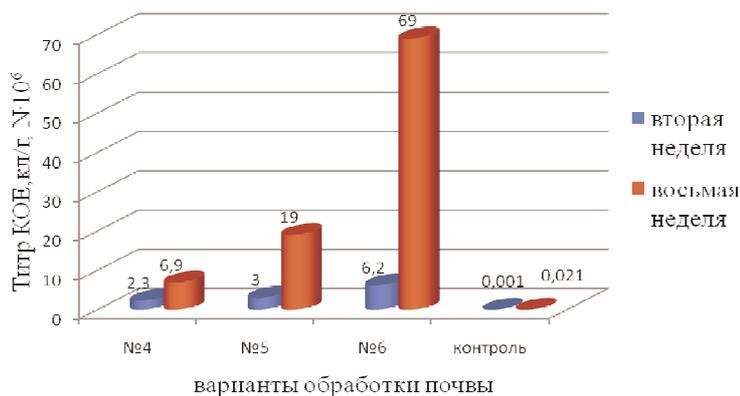


Рис. 6. Количество гетеротрофов с 20%-ным загрязнением за 4-ю и 8-ю неделю

Выводы

С учетом создания благоприятной питательной среды, соотношения биогенных элементов и влияния воздействия температуры, доступности кислорода и достаточной влажности применение исследуемых культур для ферментативной деградации углеводородного загрязнителя может быть перспективным в практическом отношении в виде смешанной культуры.

Показано, что внесение полученной в жидкофазном процессе биомассы нефтеокисляющих микроорганизмов с использованием сорбента в качестве иммобилизующего агента и корректирующих минеральных и органических добавок однозначно ускоряет процесс биоремедиации загрязненных почв.

Создаваемые условия микроразрушения, структурирование почвы, улучшение условий могут быть эффективными для микробиоценоза, увеличивают ферментативную активность собственной микрофлоры, расширяют ее качественный состав и позволяют ликвидировать загрязнения в высоких концентрациях в течение одного вегетационного периода.

Литература

- Иларионов С.А. Экологические аспекты восстановления нефтезагрязненных почв. Екатеринбург: Уро РАН, 2004. 194 с.
- Середина В.П., Бурмистрова Т.И., Терещенко Н.Н. Нефтезагрязненные почвы: свойства и рекультивация. Томск: Изд-во ТПУ, 2006. 270 с.
- Киреева Н.А., Водопьянов В.В., Мифтахова А.М. Биологическая активность нефтезагрязненных почв. Уфа: Гилем, 2001. 376 с.
- Сваровская Л.И., Иванов А.А., Юдина Н.В., Филатов Д.А. Стимулирующее влияние гуминовых кислот на оксигеназную активность микроорганизмов нефтезагрязненных почв // Биотехнология. 2007. № 6. С. 60-64.
- Пирог Т.П. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Т. 41, № 1. С. 58-63.
- Самсонова А.С., Алещенкова З.М., Ли Е. Очистка сточных вод от дизельного топлива с помощью иммобилизованных микроорганизмов-деструкторов // Биотехнология. 2003. № 4. 2003. С. 83-87.

7. Федорова О.С., Рязанова Т.В. Получение биосорбента на основе аборигенной микрофлоры для очистки нефтезагрязненных территорий // Новые экологобезопасные технологии для устойчивого развития регионов Сибири: материалы всерос. науч.- практической конф. Улан-Удэ, 2005. С. 65-70.

8. Федорова О.С. Получение комбинированного биопрепарата для борьбы с нефтяными загрязнениями на основе иммобилизованной аборигенной микрофлоры: дис. ... канд. техн. наук. Красноярск, 2005. 183 с.

9. Федорова О.С., Рязанова Т.В., Кириенко И.А. Эффективность деструкции нефтепродуктов иммобилизованной микрофлорой при разных уровнях загрязнения почвы // Вестн. КрасГАУ, 2009. № 5. С. 81-85.

10. Войно Л.И. Биодegradация нефтезагрязнений почв и акваторий // Фундаментальные исследования. 2006. № 5. С. 68-70.

11. Плешакова Е.В., Дубровская Е.В., Турковская О.В. Приемы стимуляции аборигенной нефтеокисляющей микрофлоры // Биотехнология. 2005. № 1. С. 42 – 50.

12. Колесников С.И., Казеев К.Ш., Велигонова Н.В., Патрушева Е.В., Анаурьян Д.К., Вальков В.Ф. Изменение комплекса почвенных микроорганизмов при загрязнении чернозема обыкновенного нефтью и нефтепродуктами // Агрехимия. 2007. № 12. С. 44-48.

13. Ступин Д.Ю. Загрязнение почв и новейшие технологии их восстановления. СПб.; М.; Краснодар: Лань, 2009. 432 с.

14. Нечаева И.А. Стимуляция микробной деструкции нефти в почве путем внесения бактериальной ассоциации и минерального удобрения в лабораторных и полевых условиях // Биотехнология. 2009. № 1. С. 64-66.

15. Давыдова С.Л. Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами. М.: Изд-во Рос. ун-та дружбы народов, 2006. 156 с.

References

- Ilarionov S.A. Ecological aspects of restoration petropolluted of soils. Ekaterinburg: Uro RAN, 2004. 194 p.
- Seredina V.P., Burmistrova T.I., Tereshchenko N.N. The petropolluted soils: properties and recultivation. Tomsk: Izd-vo TPU, 2006. 270 p.
- Kireeva N.A., Vodop"yanov V.V., Miftakhova A.M. Biological activity of the petropolluted soils. Ufa.: Gilem, 2001. 376 p.
- Svarovskaya L.I., Ivanov A.A., Yudina N.V., Filatov D.A. The stimulating influence of humic acids on oxygenase activity of microorganisms of the petropolluted soils // Russian Journal of Biotechnology. 2007. № 6. P. 60-64.

5. Pirog T.P. Use of the cages of the petrooxidizing microorganisms immobilized on expanded clay for water purification from oil // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2005. T. 41, № 1. P. 58-63.
6. Samsonoba A.C., Aleshenkova Z.M., Li E. Sewage treatment from diesel fuel by means of the immobilized microorganisms destructors // *Russian Journal of Biotechnology*. 2003. № 4. 2003. P. 83-87.
7. Fedorova O.S., Ryazanova T.V. Receiving a biosorbent on the basis of native microflora for cleaning of the petropolluted territories // *Novye ekologobezopasnye tekhnologii dlya ustoychivogo razvitiya regionov Sibiri: materialy vsenos. nauch.- prakticheskoi konf. Ulan-Ude*, 2005. P. 65-70.
- 8 Fedorova O.S. Receiving the combined biological product for fight against oil pollution on the basis of the immobilized native microflora: dis. ... kand. tekhn. nauk. Krasnoyarsk, 2005. 183 p.
9. Fedorova O.S., Ryazanova T.V, Kirienko I.A. Efficiency of destruction of oil products the immobilized microflora at different levels of pollution of the soil // *Vestn. KrasGAU*, 2009. № 5. P. 81-85.
10. Voino L.I. Biodegradation of petropollution of soils and water areas // *Fundamental research*. 2006. № 5. P. 68-70.
11. Pleshakova E.V., Dubrovskaya E.V., Turkovskaya O.V. Methods of stimulation of the native petrooxidizing microflora // *Russian Journal of Biotechnology*. 2005. № 1. P. 42-50.
12. Kolesnikov S.I., Kazeev K.Sh., Veligonova N.V., Patrusheva E.V., Anaur'yan D.K., Val'kov V.F. Change of a complex of soil microorganisms at pollution of the chernozemic ordinary soil by oil and oil products // *Agricultural Chemistry*. 2007. № 12. P. 44-48.
13. Stupin D.Yu. Pollution of soils and the newest technologies of their restoration. SPb.; M.; Krasnodar: Lan', 2009. 432 p.
14. Nechaeva I.A. Stimulation of microbic destruction of oil in the soil by introduction of bacterial association and mineral fertilizer in laboratory and field conditions // *Russian Journal of Biotechnology*. 2009. № 1. P. 64-66.
15. Davydova S.L. Environmental pollution by oil and oil products. M.: Izd-vo Ros. un-ta druzhby narodov, 2006. 156 p.