

Проблемы экологии и токсикологической безопасности. Утилизация опасных и вредных веществ

УДК 574

Разработка биотехнологических методов ликвидации нефтяных загрязнений окружающей среды

**В. П. Холоденко, В. А. Чугунов, С. К. Жиглецова, В. Б. Родин, З. М. Ермоленко,
В. М. Фомченков, И. А. Ирхина, В. С. Кобелев, В. Я. Волков**

ВАСИЛИЙ ПЕТРОВИЧ ХОЛОДЕНКО — руководитель проекта, доктор биологических наук, начальник отдела экологической биотехнологии ГНЦ прикладной микробиологии. Область научных интересов: биодеструкция нефти и нефтепродуктов, биокоррозия, биотестирование.

ВЛАДИМИР АЛЕКСАНДРОВИЧ ЧУГУНОВ — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ГНЦ прикладной микробиологии. Область научных интересов: биодеструкция нефти и нефтепродуктов.

СВЕТЛАНА КОНСТАНТИНОВНА ЖИГЛЕЦОВА — кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник ГНЦ прикладной микробиологии. Область научных интересов: биокоррозия.

ВЛАДИМИР БОРИСОВИЧ РОДИН — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ГНЦ прикладной микробиологии. Область научных интересов: биокоррозия.

ЗИНАИДА МИХАЙЛОВНА ЕРМОЛЕНКО — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ГНЦ прикладной микробиологии. Область научных интересов: биодеструкция нефти и нефтепродуктов.

ВИКТОР МИХАЙЛОВИЧ ФОМЧЕНКОВ — кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник ГНЦ прикладной микробиологии. Область научных интересов: биотестирование.

ИРИНА АЛЕКСАНДРОВНА ИРХИНА — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ГНЦ прикладной микробиологии. Область научных интересов: биотестирование.

ВЛАДИМИР СЕРГЕЕВИЧ КОБЕЛЕВ — кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник ГНЦ прикладной микробиологии. Область научных интересов: биокоррозия.

ВЛАДИМИР ЯКОВЛЕВИЧ ВОЛКОВ — доктор химических наук, профессор, заместитель генерального директора ГНЦ прикладной микробиологии. Область научных интересов: биодеструкция нефти и нефтепродуктов.

142279 Оболенск, Московская область, Серпуховский район, ГНЦ прикладной микробиологии, тел. (0967)36-00-68, факс (096)7-36-00-10, (096)7-36-00-61, E-mail info@nrciam.serpukhov.su

В настоящее время химическое загрязнение окружающей среды, в том числе нефтью и продуктами ее переработки, представляет особую опасность, что связано с огромными масштабами добычи, транспортировки и переработки этих энергоносителей. Угроза массированного загрязнения стимулировала разработку методов борьбы с нефтяными загрязнениями. В последнее время все больше внимания уделяется микробиологическому методу. Бесспорными преимуществами этого метода являются эффективность, экономичность, экологи-

ческая безопасность, технологическая гибкость и отсутствие вторичных загрязнений [1—3].

Наш проект, посвященный проблеме биологической очистки от нефтезагрязнений, включает комплекс задач: поиск и селекцию природных нефтеокисляющих микроорганизмов, выбор наиболее перспективных штаммов-деструкторов и разработку на их основе технологий приготовления и применения биопрепаратов для очистки нефтезагрязненных почв, выбор способов активиза-

ции аборигенной микрофлоры с целью ускорения процессов самоочистки загрязненных территорий.

Существенный вклад в профилактику химического загрязнения окружающей среды может внести борьба с биоповреждением и биокоррозией оборудования, используемого при добыче, транспортировке и хранении нефти и нефтепродуктов. В связи с этим изучалась возможность создания комплексных способов защиты оборудования от биокоррозии.

В рамках проекта исследовались также различные оценки интегральной токсичности загрязненных нефтью и нефтепродуктами почв и вод путем биотестирования на основе бактерий, микроводорослей и высших растений. Эти данные нужны для организации мониторинга загрязненных территорий и контроля эффективности биотехнологий защиты окружающей среды.

Разработка препаратов на основе нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки нефтезагрязненных почв. Активизация аборигенной микрофлоры как способ самоочистки загрязненных территорий

Селекцию углеводородокисляющих бактерий с целью создания на их основе препаратов для очистки от нефтезагрязнений проводили из коллекции природных штаммов-деструкторов, выделенных в различных почвенно-климатических регионах России и в местах, длительное время загрязненных нефтью и нефтепродуктами. Такой широкомасштабный поиск бактерий позволил получить изоляты, хорошо адаптированные к углеводородному загрязнению и устойчивые к различным неблагоприятным факторам окружающей среды, создать обширную коллекцию перспективных нефтеокисляющих бактерий.

Выбор наиболее перспективных штаммов осуществляли по таким критериям, как высокая нефтеокисляющая активность в обычных условиях и достаточно высокая активность при пониженной температуре (8—10 °С), а также возможность штаммов дополнять друг друга по способности к биодеградации различных групп нефтяных углеводородов.

Показано, что штаммы с максимальной нефтеокисляющей способностью относятся к психротрофам. Другим важным их свойством является биоэмульгирующая активность, обеспечивающая большую доступность углеводородов для бактерий и, как следствие, повышение скорости их биодеградации. На модельной смеси, содержащей такие углеводороды, как пента- и тетрадекан, 1-фенилдекан, 1-гексадецен, пристан, 1,2,4-триметилциклогексан, нафталин, изучалась специфичность нефтеокисляющих бактерий и возможность утилизации ими индивидуальных углеводородов, относящихся к различным группам. Исследования на водных и почвенных системах действия отдельных штаммов и последующий газохроматографический анализ с предварительной экстракцией углеводородов хлороформом позволили установить заметное различие между штаммами по степени утилизации углеводородов.

Бактериальные штаммы с высокой нефтеокисляющей активностью исследовали также на устойчивость к таким факторам окружающей среды, как pH, соленость, присутствие солей различных тяжелых металлов, фенола и формальдегида и др.

Удалось обнаружить штаммы, проявляющие достаточно высокую активность к присутствию тяжелых металлов и фенола в водной среде в широких интервалах pH (5,0—9,0) и солености (до 6%-ного раствора NaCl).

Крайне важным критерием применимости нефтеокисляющих бактерий для биоочистки загрязненных территорий является безопасность для человека и животных. На лабораторных животных были изучены показатели вирулентности, диссеминации, токсичности и токсигенности девяти наиболее активных бактериальных штаммов. Установлено, что все эти природные штаммы отвечают требованиям, предъявляемым к микроорганизмам 4-го класса опасности.

Идентификация наиболее активных и перспективных изолятов с помощью классических микробиологических методов показала, что исследованные изоляты относятся к родам *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*.

Результаты проведенных исследований, опубликованные в [4—17], позволили нам создать ассоциацию из четырех высокоактивных штаммов нефтеокисляющих бактерий, взаимодополняющих друг друга по ряду свойств: *Mycobacterium* sp. ИЖ-4, *M. flavescens*, *Rhodococcus* sp. 56 D/4, *Acinetobacter* sp. НБ-1. Эти штаммы были использованы при разработке лабораторных технологий приготовления жидких и сухих форм препаратов. Определены режимы культивирования, концентрирования (микрофльтрация) и приготовления различных форм препаратов.

Для сохранения жизнеспособности и нефтеокисляющей активности клеток в процессе хранения в состав разработанного нами жидкого препарата «Экойл» вводили стабилизаторы и консерванты в различных комбинациях и концентрациях. В результате были подобраны оптимальные соотношения и концентрации этих добавок, позволяющие в течение 6 месяцев сохранять функциональную активность клеток на относительно высоком уровне при 20 °С (уменьшение нефтеокисляющей активности на 30—50%).

Сухие формы препаратов получали методом лиофильного высушивания с введением криопротекторов. Выживаемость клеток в препаратах в процессе сушки составляла не менее 50%, а титр клеток в составе препарата соответствовал $(100—200) \cdot 10^9$ клеток/г сухой массы. При длительном хранении препаратов (2 года при 4 °С) количество жизнеспособных клеток уменьшилось примерно на порядок и составило $25 \cdot 10^9$ клеток/г, при этом определяемая в стандартных условиях нефтеокисляющая активность снижалась только на 46%.

Нами также разработана сухая форма препарата «Экосорб», в котором бактериальные клетки иммобилизованы на сорбенте. Иммобилизация клеток на носителе, помимо их закрепления в загрязненной почве, может повысить эффективность препарата, поскольку иммобилизованные клетки значительно более устойчивы к неблагоприятному воздействию окружающей среды. В качестве носителей были исследованы различные природные и модифицированные материалы: торф, вермикулит, активированный уголь, фэжел, лессорб. Как наиболее перспективный был выбран лессорб — продукт термической обработки растительного материала (мох и древесина).

Изучение влияния различных ксеропротекторов на сохранение жизнеспособности клеток и их нефтеокис-

Таблица 1

Биодеградация фракций нефти в дерново-подзолистой почве после внесения в нее нефтеокисляющих бактерий и добавок удобрений (продолжительность — 3 месяца)

Среда	Биодеградация фракций нефти (в %)		
	парафино-нафтеновая	ароматическая	смолисто-асфальтеновая
Нефть	28,2	15,4	5,9
Нефть+добавки	35,7	21,4	26,3
Нефть+бактерии	59,5	12,0	6,3
Нефть+бактерии+добавки	73,1	40,4	17,4

Таблица 2

Динамика биодеградации нефти в дерново-подзолистой почве после ее обработки препаратом «Экойл» и внесения добавок минеральных удобрений

Среда	Биодеградация нефти, %			
	1 мес.	3 мес.	11 мес.	16 мес.
Нефть	5,0	12,0	15,0	36,0
Нефть+добавки	16,0	21,0	26,0	50,0
Нефть+препарат	35,0	27,0	43,0	51,0
Нефть+добавки+препарат	45,0	40,3	51,7	66,0

ляющей активности показало, что некоторые сахара и аминокислоты существенно повышают выживаемость клеток и их активность в процессе высушивания и последующего хранения при 20 °С. Так, после 6 месяцев хранения выживаемость клеток уменьшилась примерно на порядок, однако уровень нефтеокисляющей активности практически не изменился и соответствовал исходному значению.

Эффективность действия жидкого препарата «Экойл» и биосорбента «Экосорб» исследовали в лабораторных и полевых условиях. опыты проводили на различных типах почв (дерново-подзолистая, серая лесная и супесчаная) с различным уровнем нефтяного загрязнения (8 и 24 л/м²).

Эффективность биоочистки нефтезагрязненных почв во многом определяется способом применения препарата, который прежде всего должен обеспечить благоприятные условия для жизнедеятельности нефтеокисляющих микроорганизмов. В связи с этим изучали влияние окружающей среды на динамику биодеградации нефти и отдельных групп углеводородов, при этом оценивали численность привнесенных в почву нефтеокисляющих бактерий и основных эколого-трофических групп почвенной микрофлоры. За изменением этих показателей наблюдали в деляночных опытах в течение 11 месяцев. Установлено, что загрязнение почв нефтью заметно подавляет развитие таких групп почвенных микроорганизмов, как сапрофиты, микромицеты, актиномицеты, нитрификаторы и денитрификаторы. Обработка почв жидким и сухим препаратами позволяет в значительной степени снизить ингибирующее действие углеводородов нефти на почвенную микрофлору. При внесении в почву биогенных элементов (азотно-

фосфорные минеральные и органические удобрения) численность некоторых групп даже несколько возрастает по сравнению с исходной незагрязненной почвой.

Исследование динамики утилизации углеводородов нефти (гравиметрический и хроматографический методы) показало, что наиболее легко утилизируется парафино-нафтеновая фракция, менее — ароматическая, а наиболее устойчивая — смолисто-асфальтеновая. Степень биодеградации этих фракций существенно возрастает при обработке почв препаратами, однако лучшие результаты были получены при одновременном внесении в почву препаратов минеральных и органических удобрений (табл. 1).

В серии других полевых экспериментов (с использованием добавок) проводили двойную обработку аммофосом, с перерывом между обработками в один месяц, и через 1, 3, 11 и 16 месяцев определяли остаточное содержание нефтяных углеводородов в почве (табл. 2). Как следует из полученных результатов, повторные обработки азотно-фосфорным удобрением заметно стимулируют биодеградацию нефти. Эти данные свидетельствуют также об адаптации аборигенной нефтеокисляющей микрофлоры почвы к нефтяному загрязнению, что приводило к существенному ускорению биодеградации нефти в контрольном опыте, особенно при внесении стимулирующих добавок.

Сравнение жидкого препарата с биосорбентом показало, что при среднем уровне загрязнения почвы (8 л/м²) их эффективность весьма близка, но при высоком уровне загрязнения (24 л/м²) эффективность биосорбента заметно выше.

Полученные результаты позволяют заключить, что применение разработанных препаратов нефтеокисляю-

щих штаммов вполне оправдано при высоких уровнях углеводородного загрязнения почв, при необходимости скорейшей очистки территории или когда аборигенная микрофлора развита слабо, например, в бедных почвах. В то же время активизация местной микрофлоры путем создания благоприятных условий для ее жизнедеятельности может быть достаточно эффективным и экономичным способом биоочистки нефтезагрязненных территорий.

Разработка методов защиты оборудования нефтепромыслов от биоповреждений

Наиболее распространенным и эффективным способом борьбы с биодеструкцией является применение биоцидов. С точки зрения повышения экологической безопасности и снижения стоимости противокоррозионных мероприятий хорошие результаты дают синергические комбинации биоцидов, а также их комбинации с ингибиторами химической коррозии.

Использование экологически менее опасных биоцидных композиций, хотя и позволяет существенно снизить вредные последствия их применения для окружающей среды, но не могут их полностью исключить. Отметим, что существующие биологические методы борьбы с биоповреждениями основаны преимущественно на антагонистических взаимоотношениях микроорганизмов [18] или образовании защитных биопленок. В последнем случае ингибирование коррозии происходит или за счет образования защитной неорганической пленки микробного происхождения [19], либо связано с метаболической активностью живой биопленки [20].

В рамках нашего проекта при разработке методов борьбы с биокоррозией были выделены штаммы-деструкторы промышленных материалов и изучены их свойства, исследовано повреждающее действие на них биоцидов и на этой основе разработаны синергические композиции биоцидов и антикоррозионных добавок.

В результате скрининга 52-х гетеротрофных и 20-ти сульфатовосстанавливающих бактерий, а также 40 грибных штаммов относительно деструкции стали было выделено 16 активных деструкторов стали: 11 аэробных бактерий и 5 микромицетов. Чистые культуры исследованных сульфатовосстанавливающих бактерий почти на порядок менее коррозионно активны, чем выделенные природные анаэробные ассоциации. Разработан метод экспресс-оценки коррозионной активности микроорганизмов по накоплению в среде ионов железа [21], позволяющий сократить продолжительность первичного отбора деструкторов: для бактерий до 1—2 сут, для грибов до 4—7 сут.

На выделенных микроорганизмах-деструкторах были проведены исследования повреждающего действия биоцидов. Классические методы определения действующих концентраций биоцидов [22, 23] имеют некоторые сложности: они трудоемки, длительны (иногда несколько суток), к тому же они относятся к полуквантитативным методам [24]. Нами были разработаны количественные экспресс-методы определения концентраций биоцидов: электроориентационная спектроскопия (ЭО-тест) [25] и способ определения редуцирующей активности микроорганизмов по отношению к органическому красителю (РА-тест) [26]. Методы позволяют выявить действие биоцидов на отдельные клеточные

структуры и очень удобны в качестве экспресс-методов для первичной оценки повреждающего действия. В ряде случаев эти способы давали результаты, сопоставимые с контрольным классическим методом. Однако чаще наблюдалось несоответствие, что неудивительно, поскольку устойчивость микроорганизмов к биоцидам зависит от комплекса факторов, которые в полной мере проявляются только в случае использования прямых методов определения жизнеспособности микроорганизмов.

В связи с этим нами были разработаны прямые количественные методы оценки действия биоцидов на микроорганизмы, основанные на применении плотных питательных сред [27]. При этом поступали следующим образом. Действующие концентрации биоцидов разделяли на замедляющие рост (*S*-концентрации) и сублетальные (*L*-концентрации). За *S*- и *L*-концентрации принимали соответственно снижающие максимальную удельную скорость роста (μ'_m) биомассы колоний и уменьшающие число колониеобразующих единиц (КОЕ). Величину μ'_m рассчитывали по упрощенной модели роста колоний одноклеточных микроорганизмов [28]. Такой подход позволил установить, что устойчивость к биоцидам зависит от вида питательного субстрата [27] и сроков введения в него биоцидов [29].

При поиске синергических комбинаций было изучено действие 22-х парных сочетаний биоцидов. Выявлено пять синергических комбинаций, из которых наиболее выраженным синергизмом обладает комбинация 2-октил-4-изотиазолинтриона (катон) с сульфатом меди. Разработанные прямые количественные методы позволили установить, что в интервале сублетальных концентраций наибольшую эффективность проявляет смесь с соотношением сульфата меди к катону 1,2. В этом случае по сравнению с индивидуальным действием биоцидов концентрация катона снижается в 21, а сульфата меди — в 4 раза.

Показана целесообразность применения смеси биоцидов и солей-пассиваторов. Установлено, что подобная комбинация при защите от биокоррозии снижает коррозионные потери в несколько раз по сравнению с использованием по отдельности биоцидов или пассиваторов [29].

Таким образом, разработанные нами методы позволяют быстро подобрать для конкретной системы наиболее эффективные биоциды, точно определить необходимые концентрации, рассчитать эффективность совместного действия биоцидов и других компонентов антикоррозионных композиций (ингибиторов электрохимической коррозии, солей — пассиваторов, пенетрантов и т.д.), а в случае синергического эффекта определить наиболее эффективное их сочетание.

С целью разработки биологических методов борьбы с биокоррозией были выделены пять штаммов бактерий и два штамма микромицетов-антагонистов. Установлено, что в зависимости от вида антагонистов и деструкторов и их соотношения в инокуляте биокоррозия стали уменьшается на 20—80% [30]. Проведенные исследования показали принципиальную возможность применения выделенных микроорганизмов-антагонистов для подавления биокоррозии. Однако практическое использование метода на их основе пока проблематично, поскольку все выделенные штаммы-антагонисты вызыва-

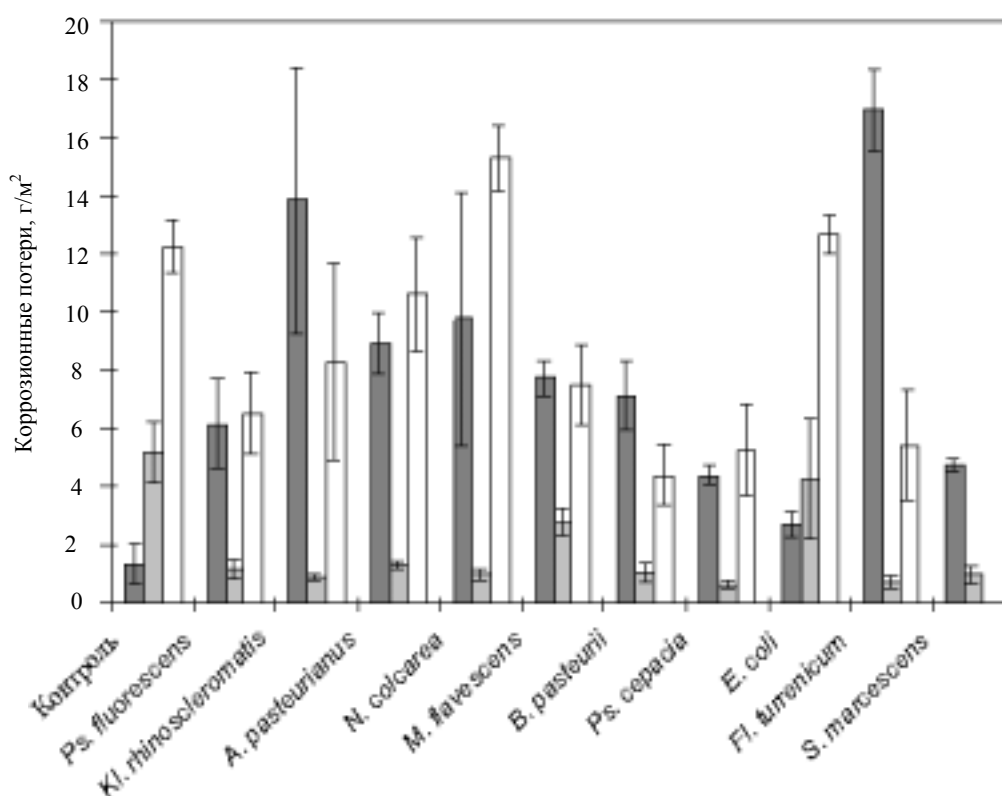


Рис. 1. Коррозионные потери в разных питательных средах с микроорганизмами.

Продолжительность испытаний 14 сут. ■ глюкозо-минеральная среда (ГМ), — питательный бульон, □ ГМ/10

ют слабую биокоррозию, кроме того, найти абсолютного антагониста, который в естественных условиях смог бы подавлять все возможные микроорганизмы-деструкторы, представляется маловероятным.

Более перспективным оказался второй подход — создание защитных биопленок. Нами исследована зависимость защитного эффекта биопленок от характера их метаболической активности. Изучена биокоррозионная активность 11-ти аэробных бактерий, принадлежащих к различным таксономическим группам, в глюкозо-минеральной среде (ГМ) с содержанием глюкозы 5 г/л, в бедной среде, содержание всех компонентов в которой по сравнению с исходной средой уменьшено в 10 раз (ГМ/10) и на питательном бульоне Nutrient Broth «Difco» — 8 г/л.

Показано, что в среде ГМ все бактерии вызывают наибольшие биокоррозионные потери, те же бактерии на питательном бульоне проявляют себя как пассиваторы, уменьшая коррозионные потери относительно контрольной (стерильной) среды (рис. 1), в среде ГМ/10 в целом все исследованные микроорганизмы оказывают слабое коррозионное воздействие. Такие же закономерности зафиксированы и при изучении влияния питательного субстрата на коррозионную активность микроорганизмов. Так, в среде Чапека—Докса при высоком содержании глюкозы биокоррозионные потери более чем в 10 раз превышают электрохимическую коррозию в стерильной среде, в бедной среде Чапека—Докса с пониженным содержанием всех компонентов биодест-

руктивный эффект выражен слабее, а на питательном бульоне коррозионные потери по сравнению со стерильной контрольной средой снижаются в 2—4 раза.

Исследовано также влияние на биокоррозию замены глюкозы в глюкозо-минеральной среде на различные углеводы, утилизация которых сопровождается разной степенью закисления среды. Установлена корреляционная зависимость между величиной коррозионных потерь и значением pH среды в конце культивирования [30].

Полученные результаты позволили сделать вывод о том, что величина и направленность биокоррозионной активности аэробных микроорганизмов зависит от концентрации и вида питательного субстрата, так что разделение микроорганизмов на деструкторы и пассиваторы условно. Можно лишь говорить о том, что в зависимости от концентрации и вида питательного субстрата микроорганизмы в большей или меньшей степени могут проявлять либо деструктивные, либо пассивирующие свойства.

Изменение состава окружающей (питательной) среды может рассматриваться как перспективное направление для защиты металлов от биокоррозии. Для окончательного заключения необходимо выяснить такие практические аспекты применения данного метода, как действительность его в случае использования различных естественных ассоциаций микроорганизмов, влияние концентрации защитного субстрата и режима его введения в систему, а также стоимость данного способа обработки.

Биологические методы оценки интегральной токсичности объектов окружающей среды

Эффективная защита окружающей среды от различных загрязнений невозможна без получения достоверной информации о степени загрязнения почв и вод. Одним из перспективных направлений решения данной проблемы является применение биологических методов анализа, в которых регистрируется реакция биологического тест-объекта на пробу почвы и воды и по характерным признакам определяется наличие в ней токсиантов. При этом биологический объект проявляет обобщенную (интегральную) реакцию на действие неблагоприятных факторов и служит датчиком биологической доброкачественности природной среды [31, 32].

Универсальной тест-системы, позволяющей обнаруживать все возможные токсианты одинаково надежно, не существует. Поэтому все более широкое применение в практике экологического контроля находят наборы тестов с использованием различных тест-организмов [33]. В каждом конкретном случае преимущества одних тестов восполняют ограничения других, и точность оценки интегральной токсичности природной среды возрастает. Нашей задачей было выбрать среди существующих тест-методов наиболее доступные, быстрые, чувствительные, дешевые и адаптировать их применительно к биотестированию интегральной токсичности воды и почвы, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. На основании предварительных экспериментов было решено использовать следующие методы биотестирования: биолюминесцентный (БЛ) тест на фотобактериях, электроориентационный (ЭО) и осмооптический (ОО) тесты на различных бактериях, фотоколориметрический тест на редуцирующую активность микроорганизмов (РА-биотест), ростовые тесты на бактериях, микроводорослях и высших растениях.

БЛ-тест заключается в измерении свечения фотобактерий и ингибирования его при добавлении загрязненной воды. В ЭО-биотесте по уровню изменения вы-

сокочастотного спада ЭО-спектра контрольных и обработанных клеток судят о степени повреждения последних. ОО-биотест основан на регистрации изменения осмооптического эффекта грамотрицательных бактерий, вызванного нарушением барьерных свойств клеточных мембран в опытных образцах в сравнении с контрольными. В РА-тесте фотоколориметрически или визуально (по цветовому ряду) определяется редуцирующая активность тест-культуры по отношению к органическому окислительно-восстановительному красителю. В ростовом тесте фотоколориметрически измеряется оптическая плотность клеточной суспензии через сутки после введения в ростовую среду анализируемого образца.

Все указанные биотесты характеризуют действие загрязнителя на различные биологические показатели тест-культур: БЛ- и РА-биотесты — на изменение активности внутриклеточных ферментов, ЭО- и ОО-биотесты — на изменение барьерных свойств клеточных мембран, а ростовой тест — на способность клеток к росту и размножению. ЭО-, ОО-, РА- и БЛ-тесты являются экспрессными, они дают первичную реакцию тест-культур на загрязненную среду. Ростовый тест более продолжителен (сутки и более), и он позволяет выявить возможную адаптацию тест-культур к загрязнению [34, 35].

Скрининг тест-организмов на их чувствительность к нефти и нефтепродуктам, проведенный с каждым методом биотестирования, показал, что наиболее точные и воспроизводимые измерения достигаются при использовании в качестве тест-организмов бактериальных клеток *Agrobacterium radiobacter* ВКМ В-1218 и *Pseudomonas stutzeri* ВКМ В-903; довольно высокую чувствительность к данным поллютантам проявляют и одноклеточные водоросли *Euglena gracilis* JPPASE-236.

Апробация разработанных методик для оценки интегральной токсичности загрязненных нефтью и нефтепродуктами вод и почв на модельных средах подтвердила применимость этих методов к такого рода анализам. В ростовом тесте на *A. radiobacter* при низком уровне загрязнения (1%) исследованные поллютанты по

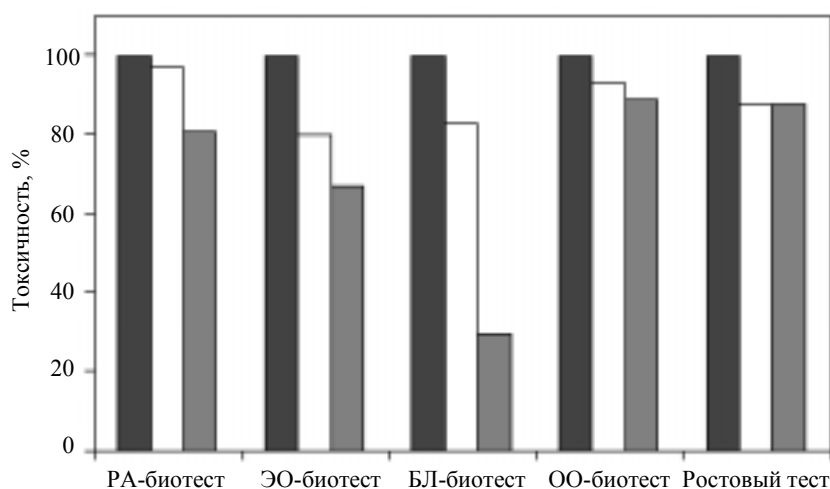


Рис. 2. Интегральная токсичность водной среды, загрязненной керосином (5%), после его биодеструкции ассоциацией штаммов-деструкторов.

Продолжительность эксперимента 5 суток.

■ — контрольный опыт (без керосина); □ — керосин; ▒ — керосин+ штаммы-деструкторы

степени снижения их токсичности можно расположить в следующий ряд: дизельное топливо > бензин > керосин > нефть, при высоком уровне загрязнения (20%) последовательность несколько иная: бензин > дизельное топливо > реактивное топливо > керосин > нефть. Ростовый тест на микроводорослях показывает, что дизельное топливо менее токсично, чем керосин по отношению к эвгленам, вместе с тем токсичность обоих поллютантов с ростом их концентрации в среде увеличивается. В РА-биотесте на *Agrobacterium radiobacter* токсичность эмульсии поллютантов (5%) снижается в ряду: дизельное топливо > керосин > нефть. В БЛ-тесте концентрация поллютанта, вызывающая через 15 мин 20%-ное ингибирование свечения, равна для бензина и дизельного топлива — 0,001%, для нефти — 0,01% и для керосина — 0,3%. Зависимость интенсивности свечения от времени у разных поллютантов различная.

Сравнение выбранных методов (по результатам определения эффективной концентрации керосина, вызывающей 20%-ное уменьшение контролируемого параметра) показало (рис. 2), что наибольшую чувствительность к загрязнениям имеет БЛ-тест на *Photobacterium leiognathi* ВКМ В-1719, затем следуют примерно равные по чувствительности РА- и ростовой биотесты на *Euglena gracilis* JPPASE-236 и, наконец, ростовой биотест на *Agrobacterium radiobacter* ВКМ В-1218 и ЭО-тест.

Согласно исследованиям изменения интегральной токсичности водной среды в процессе биодеструкции загрязняющих ее нефтепродуктов с помощью ассоциации штаммов-деструкторов экспресс-методы, как правило, выявляют первичную негативную реакцию клеточ тест-культуры на анализируемую среду. Более длительный ростовой бактериальный тест не дает столь однозначных результатов. В опытах мы наблюдали как стимулирующее, так и ингибирующее влияние среды после биодеструкции на тест-культуру. Это свидетельствует о сложности процессов, происходящих при биодеструкции, и о возможной адаптации (выживание и размножение) бактериальных клеток к таким средам [34].

Апробация методики оценки интегральной токсичности загрязненной почвы с использованием высших растений на модельном загрязнении почвы нефтью и дизельным топливом показала, что по чувствительности к таким загрязнениям ряд огородных культур (горчица, салат, укроп) превосходит злаковые (овес, рожь, ячмень). Причем токсичность поллютантов проявляется как в уменьшении всхожести семян, так и в снижении таких показателей роста растений, как длина проростков и корней, а также сухой массы наземной части растений. При использовании в качестве тест-организма горчицы наблюдали заметное снижение токсичности почвы после биодеструкции загрязняющего ее дизельного топлива [35].

Полученные данные свидетельствуют о перспективности применения разработанных методик для оценки интегральной токсичности воды и почвы, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, и ее изменения в процессе биодеградации этих загрязнителей различными штаммами-деструкторами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Morgan P., Watkinson R.J. Crit. Rev. Biotechnol., 1989, v. 8, p. 305—333.
2. Bartha R. Microb. Ecol., 1986, v. 12, p. 155—172.
3. Leahy J.G., Colwell R.R. Microbiol. Rev., 1990, v. 54, p. 305—315.
4. Ермоленко З.М., Холоденко В.П., Чугунов В.А. и др. Микробиология, 1997, т. 66, № 5, с. 650—654.
5. Ермоленко З.М., Чугунов В.А., Герасимов В.Н. и др. Биотехнология, 1997, т. 66, № 5, с. 33—38.
6. Герасимов В.Н., Ермоленко З.М., Штучная Г.В. и др. Там же, 1996, т. 65, №5, с. 17—24.
7. Чугунов В.А., Ермоленко З.М., Жиглецова С.К. и др. Прикл. биохим. микробиол., 2000, т. 36, № 6, с. 666—671.
8. Чугунов В.А., Ермоленко З.М., Жиглецова С.К. и др. Там же, 2000, т. 36, № 6, с. 661—665.
9. Патент РФ № 2077578, 1997.
10. Патент РФ № 2077579, 1997.
11. Патент РФ № 2101352, 1997.
12. Патент РФ № 2134723, 1999.
13. Патент РФ № 2134722, 1999.
14. Патент РФ № 2133769, 1999.
15. Патент РФ № 2133770, 1999.
16. Патент РФ № 2129603, 1999.
17. Патент РФ № 2053296, 1996.
18. Booth G.H. Microbial corrosion. London: Mills and Boon Ltd, 1971, p. 250.
19. Jayaraman A., Eartman J.C., Wood T.K. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1997, v. 47, p. 62—68.
20. Hernandez G., Kucera V., Thierry D. e. a. Corrosion, 1994, v. 50, p. 603—608.
21. Жиглецова С.К., Родин В.Б., Кобелев В.С. и др. Прикл. биохим. микробиол., 2000, т. 36, № 6, с. 637—641.
22. Андreyuk E.A., Билай Р.А., Коваль Э.З. и др. Микробная коррозия и ее возбудители. Киев: Наукова думка, 1980, 288 с.
23. Mansfeld F., Xiao H. Microbiologically influenced corrosion testing. Philadelphia: ASTM, 1994, p. 42—60.
24. Piddock J.V. J. Appl. Bacteriol, 1990, v. 68, p. 307—318.
25. Фомченков В.М., Жиленков В.П., Холоденко В.П. и др. Биотехнол., 1993, т. 62, № 6, с. 33—36.
26. Новиков И.А., Гуров Б.П., Штучная Г.В. и др. Прикл. биохим. микробиол., 2001, т. 37, № 1, с. 123—128.
27. Родин В.Б., Жиглецова С.К., Акимова Н.А. и др. Там же, 2000, т. 36, № 6, с. 701—705.
28. Родин В.Б., Паников Н.С., Кобелев В.С. и др. Там же, 1998, т. 34, № 4, с. 403—409.
29. Жиглецова С.К., Кобелев В.С., Гоготова Г.И. и др. Тез. докл. 3 Межд. конгресс «ЭКВАТЭК-98». Москва, 1998, с. 252.
30. Родин В.Б., Жиглецова С.К., Кобелев В.С. и др. Прикл. биохим. микробиол., 2000, т. 36, № 6, с. 679—684.
31. Бурдин К.С. Основы биологического мониторинга. М.: Изд-во МГУ, 1985, 158 с.
32. Никитина З.И. Микробиологический мониторинг наземных экосистем. Новосибирск: Наука, 1991, 222 с.
33. Фомченков В.М., Холоденко В.П., Ирхина И.А. и др. Биотестирование интегральной токсичности загрязненных почв и вод. М.: Изд-во НИИ экономики медицинской промышленности, 1996, 31 с.
34. Фомченков В.М., Ирхина И.А., Новиков И.А. и др. Прикл. биохим. микробиол., 2000, т. 36, № 6, с. 656—660.
35. Петухов В.Н., Фомченков В.М., Чугунов В.А. и др. Там же, 2000, т. 36, № 6, с. 652—655.