

ПОТЕНЦИАЛ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПРОЦЕССАХ ОЧИСТКИ СУБСТРАТОВ ОТ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕНИЙ¹

THE POTENTIAL OF HYDROCARBON- OXIDIZING MICROORGANISMS FOR USE IN THE PROCESSES OF CLEANING SUBSTRATES FROM OIL POLLUTION

A. Vit
A. Saltykova
L. Erofeevskaya
E. Dalbaeva

Summary. It is shown that in the conditions of laboratory experience, the bacterial strain *Bacillus subtilis* isolated from the permafrost soil of Yakutia has a high activity in the field of oil pollution utilization. The use of the isolated strain in the process of bioremediation of oil pollution has significant potential in terms of environmental sustainability and purification efficiency. *Bacillus subtilis* can be a valuable resource for biotechnological processes of refining petroleum products. These studies shed light on the prospect of using *Bacillus subtilis* as bioremediants for the disposal of oil pollution. This allows us to consider new approaches and technologies in the field of cleaning and restoration of ecosystems affected by oil accidents and industrial emissions.

Keywords: oil, recultivation, soil, biological product, hydrocarbon-oxidizing microorganisms, *Bacillus subtilis*.

Вит Алина Александровна

Аспирант, ФИЦ «Якутский научный центр
Сибирского отделения Российской академии наук»,
alina_vit@list.ru

Салтыкова Анастасия Леонидовна

ФГБОУ ВО «Арктический государственный
агротехнологический университет»,
ny94@list.ru

Ерофеевская Лариса Анатольевна

Кандидат биологических наук, старший научный
сотрудник, ФИЦ «Якутский научный центр СО РАН» —
обособленное подразделение

Институт проблем нефти и газа СО РАН;

Доцент, Горный институт СВФУ им. М.К. Аммосова,
lora-07.65@mail.ru

Далбаева Елена Александровна

Аспирант, инженер-исследователь, ФИЦ «Якутский
научный центр СО РАН» — обособленное подразделение
Институт проблем нефти и газа СО РАН
aselka@mail.ru

Аннотация. Показано, что в условиях лабораторного опыта бактериальный штамм *Bacillus subtilis*, выделенный из мерзлотной почвы Якутии, обладает высокой активностью в области утилизации нефтезагрязнения. Применение выделенного штамма в процессе биоремедиации нефтяных загрязнений имеет значительный потенциал с точки зрения экологической устойчивости и эффективности очистки. *Bacillus subtilis* может представлять ценный ресурс для биотехнологических процессов очистки нефтепродуктов. Данные исследования проливают свет на перспективу использования *Bacillus subtilis* в качестве биоремедиантов для утилизации нефтяных загрязнений. Это позволяет рассмотреть новые подходы и технологии в области очистки и восстановления экосистем, пострадавших от нефтяных аварий и промышленных выбросов.

Ключевые слова: нефть, рекультивация, почва, биопрепарат, углеводородо-кисляющие микроорганизмы, *Bacillus subtilis*.

Введение

Нефтедобыча является одной из основных отраслей промышленности в Республике Саха (Якутия), поэтому играет важную роль в экономике региона. Однако, несмотря на значительные экономические выгоды, нефтепромыслы влияют на окружающую среду, приводя к загрязнению почвы и воды нефтепродуктами (НП). Это вызывает снижение плодородия почвы,

уничтожение растительного и животного мира, а также угрожает здоровью местных жителей. Известно, что нефтезагрязненные земли в условиях Крайнего Севера восстанавливаются в течение многих лет [1., С. 140–159; 2, 511 с.; 3, 360 с; 4, 243 с.]. На реабилитацию мерзлотных почв оказывает влияние рационированное использование природных ресурсов, правильное планирование нефтедобычи, труднодоступность мест аварийных нефтеразливов, а также применяемые методы рекультивации.

¹ Работа выполнена в рамках проекта НОЦ «Север» с использованием научного оборудования ЦКП Федерального исследовательского центра Якутского научного центра СО РАН в рамках реализации мероприятий по гранту № 13.ЦКП.210016.

Значительная часть территории Российской Федерации относится к Арктической зоне, а 95 % расположено в лесном фонде [5, С. 185–194]. Земли лесного назначения очень трудно поддаются рекультивации по причине, связанной с прохождением транспортной техники. Так, ягель восстанавливается в течение 25–30 лет, а для восстановления древостоя на нефтезагрязненных территориях в условиях криолитозоны может потребоваться до 100 лет. Одной из возможных стратегий восстановления нефтезагрязненных земель лесного фонда является использование специальных транспортных средств и оборудования, разработанных для работы в условиях леса. Эти средства и оборудование могут включать в себя низконагруженные устройства и широкие колеса или гусеницы, которые позволяют снизить негативное влияние на почву и растительный покров. Также важно разработать и применять методы рекультивации, которые максимально учитывают особенности почвы и растительности лесных земель. Например, использование семян или саженцев лесных растений, адаптированных к местным условиям. Такой подход с применением фиторекультивации на нарушенных землях помогает ускорить процесс восстановления лесного покрова.

1. В зависимости от степени повреждения почвы, могут использоваться различные методы рекультивации, включая применение органических и минеральных удобрений, биологическую рекультивацию (например, использование специальных грибов и бактерий), а также создание искусственных консорциумов полезных микроорганизмов, способствующих восстановлению почвенной структуры [6, С. 92–100; 7, С. 54–60].

Важным аспектом рекультивации лесных земель является также учет потенциальных экологических последствий и негативного воздействия на биологическое разнообразие. Мерзлотные почвы имеют специфическую структуру и свойства, и их восстановление требует особого подхода. Это связано с особенностями процессов, происходящих в мерзлых почвах, таких как периодическое оттаивание-замерзание и миграция воды в почвенном профиле. Кроме того, они включают в себя комплексные экосистемы с разнообразным растительным и животным миром, которые также требуют внимания при рекультивации. Таким образом, воздействие нефти на биологическое разнообразие может быть разрушительным, выражается в различных негативных последствиях и охватывает следующие аспекты:

1. Загрязнение водных и прибрежных экосистем. Разливы нефти в океанах, реках или прибрежных зонах приводят к поверхностному и подводному загрязнению. Нефть формирует плотные пленки на поверхности воды, которые могут препятствовать доступу кислорода к морским организмам и растениям, а также вызывать удушье и утопление животных. Загрязнение морского дна

и береговой зоны может негативно влиять на растения, животных и микроорганизмы, нарушая их жизненную среду и пищевую цепь.

2. Токсичность нефти. Нефть содержит различные токсичные вещества, такие как полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), фенолы и тяжелые металлы. Эти вещества могут оказывать вредное воздействие на организмы, вызывая токсические эффекты, такие как повреждение клеток, нарушение функций органов и систем, изменение роста и развития, а также повышенную смертность организмов.
3. Повреждение морских и прибрежных экосистем. Нефть может загрязнять морские воды, песчаные пляжи, морские растения и рифы, вызывая их увядание и гибель. Это может привести к потере биологического разнообразия, поскольку многие виды животных и растений зависят от этих мест в качестве места обитания, питания и размножения.
4. Негативное влияние на пищевую цепь. Загрязнение нефтью может привести к сокращению пищевых ресурсов, таких как планктон, рыбы и другие морские организмы, поскольку они могут быть отравлены или лишены пищевых источников. Это может вызвать снижение популяции и разнообразия морской жизни, а также негативно сказаться на рыболовстве и промышленной деятельности, зависящей от морских ресурсов.
5. Долгосрочные последствия. Загрязнение нефтью может иметь долговременные эффекты на экосистемы и биологическое разнообразие. Оно может привести к накоплению токсических веществ в почвах и воде, что оказывает влияние на микроорганизмы и нарушает биохимические процессы. Это может вызывать понижение плодородия почвы и длительные изменения в экосистемах, которые могут требовать десятилетия для восстановления.

В целом, воздействие нефти на биологическое разнообразие крайне важно и требует принятия мер для предотвращения загрязнения и минимизации его негативных последствий. Поэтому, при планировании и осуществлении мероприятий по рекультивации, необходимо учитывать все аспекты сохранения природы и устойчивого развития. Правильное планирование и инновационные подходы помогут справиться с проблемами и достичь успешной рекультивации этих земель. Рациональное использование природных ресурсов и правильное планирование нефтедобычи также позволяют снизить негативное воздействие на мерзлотные почвы. Например, использование технологий горизонтального бурения позволяет сократить количество прокладываемых трубопроводов, что уменьшает нарушение почвенного покрова и минимизирует разрушение мерзлоты.

Тем не менее, даже при соблюдении правильной технологии добычи нефти неизбежно возникает загрязнение почвы нефтепродуктами (НП). В таких случаях важно принять меры по рекультивации. Биологическая рекультивация может быть эффективным методом восстановления мерзлотных почв. Она включает использование микроорганизмов, таких как бактерии и грибы, которые способны биологически разлагать нефтепродукты и восстанавливать почву. Дополнительно, может потребоваться восстановление растительного покрова для укрепления почвы и активации её стабилизации. Однако, следует учитывать особенности мерзлых почв, такие как низкая температура и ограниченная доступность кислорода. Поэтому важно выбрать правильные микроорганизмы и создать оптимальные условия для их жизнедеятельности. Таким образом, рекультивация мерзлых почв требует комплексного подхода и сочетания различных методов. Рациональное использование ресурсов и правильное планирование нефтедобычи сокращают негативное влияние, а биологическая рекультивация помогает восстановить почву и ее экологические функции. Это позволяет достичь экологической безопасности и сохранения биологического разнообразия на мерзлотных почвах Крайнего Севера.

Цель данного исследования заключалась в поиске эффективного штамма, способного к деградации нефтезагрязнения.

Для достижения поставленной цели были выполнены следующие задачи:

1. Сбор образцов почвы из участков, загрязненных нефтью, для микробиологического анализа;
2. Исследование микроорганизмов, присутствующих в образцах, с целью выявления потенциальных деградантов нефти;
3. Определение потенциала разложения нефти в накопительной культуре;
4. Выделение и изучение наиболее эффективных штаммов, способных эффективно деградировать нефть в условиях лабораторного опыта;
5. Определение оптимальных условий для роста и активности эффективных штаммов, включая температуру, pH и наличие необходимых питательных веществ.
6. Генетическая идентификация отобранного штамма, способного к деградации нефти в условиях лабораторного опыта.
7. Формирование выводов и рекомендаций по использованию эффективного штамма в практике биоремедиации нефтезагрязнений.

Материалом для микробиологических исследований служили:

1. Образец нефтезагрязненной мерзлотной почвы, отобранный на территории Республики Саха (Якутия).

2. Культура углеводородокисляющих бактерий рода (*Bacillus*), выделенная из образца нефтезагрязненной мерзлотной почвы, отобранного на территории северо-восточной части Республики Саха (Якутия).

Методы исследований

Для культивирования углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) использовали разнообразные вариации питательных сред, включая жидкую — и твердую среду Мюнца [8, 10 с.]. Каждая среда содержала 1 % нефти. В случае жидких сред, УОМ были выращены при температуре $+20\pm 1^\circ\text{C}$ и скоростью вращения 180 оборотов в минуту в течение периода от 6 до 120 суток.

В данном исследовании была проведена оценка эффективности бактериальной культуры. *Bacillus subtilis* деградировать нефтезагрязнение в условиях лабораторного опыта.

Деструкцию нефти определяли визуально, основываясь на наблюдении лизиса (растворения нефти), дезинтеграции нефтяного слоя и образования пигмента. Степень деградации нефти оценивалась с использованием 3-х бальной шкалы, где выделенные УОМ были отнесены к одному из следующих разрядов:

«+++» высокая активность в области утилизации нефтезагрязнения;

«++» удовлетворительная активность в области утилизации нефтезагрязнения;

«+» слабая активность в области утилизации нефтезагрязнения;

«-» микроорганизм, не способный утилизировать нефтезагрязнение.

Результаты и обсуждение

Культура *Bacillus subtilis* получена из почвенных образцов, отобранных в Момском улусе, Северо-восточной части Республики Саха (Якутия). Генетическая идентификация штамма была выполнена на базе ФГУП «ГосНИИгенетика» (ВКПМ, Москва, 1 Дорожный пер.).

В результате анализа последовательности варибельных участков 16S rDNA была обнаружена и получена следующая нуклеотидная последовательность (рис. 1).

С целью проведения более детального анализа, полученные секвенции были обработаны с использованием компьютерной программы, доступной на веб-платформе RDB II (Ribosomal Database Project II). Результаты обработки секвенсов подробно представлены в табл. 1, приведенной ниже.

CTTCTGCMTCAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCCTCCCCGGTTGAG
 CCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACG
 CCCAATAATTCGGGACAA CGCTTGCCA CCTACGTATTACCGCGGCTGCT
 GGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGC
 CCTATTTGAACGGCACTTGTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCC
 GAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCAT
 TCGGGAAGA TTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCT
 CAGTCCCAGTGTGGCCGA TCA CCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTYGC
 CTTGGTGAGCCR TTACCTACCAACTAGCTAA TCGCCCGCGGGTCCATC
 TGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCATGCGGTTCAA
 ACAAGCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTAC
 AGGCAGGTTACCCACGTGTTA CTCACCCGTCCGCGCTAACATCAGGG
 AGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGTCATGTATTAGGCACGCCGCC
 AGCGTTCGTCTGAGCCAGGATCAA ACTCT

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность для штамма *Bacillus subtilis*

Таблица 1.

Результаты обработки последовательностей

Name (наименование)	Strain (штамм)	Accession (присоединение, последовательность)	Pairwise Similarity (парное сходство), (%)	Diff/Total (Разница/Всего), nt
<i>B. subtilis</i>	DSM10 (T)	AJ276351	98,6	1/940
<i>B. mojavensis</i>	IF015718 (T)	AB021191	98,6	1/942
<i>B. vallismortis</i>	DSM11031 (T)	AB021198	98,8	1/992
<i>B. atrophaeus</i>	JCM9070 (T)	AB021181	98,8	1/969
<i>B. subtilis</i>	NRRL B-23049 (T)	AF074970	98,8	1/935
<i>B. amyloliquefaciens</i>	NBRC 15535	AB255669	98,6	1/960
<i>B. methylophilus</i>	CBMB205 (T)	EU194897	98,0	1/903
<i>B. siamensis</i>	PD-A10 (T)	GQ281299	98,1	1/965
<i>B. tequilensis</i>	10b (T)	HQ223107	98,4	1/926
<i>B. licheniformis</i>	ATCC14580 (T) DSM13	CP000002	98,0	1/887
<i>B. amyloliquefaciens</i>	DSM7 (T)	FN597644	98,6	1/976

Дополнительный анализ, проведенный с использованием базы данных RDP II и последовательностей 16S рРНК, подтвердил гомологию исследуемого штамма с уже ранее идентифицированными видами бактерий. Это подтверждает правильность определения и классификации штамма на основании генетических данных и подтверждает его принадлежность к определенной систематической группе. На основе этих данных было построено филогенетическое дерево, на котором отражена близость родственных штаммов (рис. 2).

При проведении идентификации исследуемых штаммов использовался специальный метод с использованием видоспецифических праймеров. Этот метод известен

своей способностью к более точной идентификации, поскольку праймеры специфично связываются с уникальными участками генома конкретного вида. Это позволяет получить детальные и достоверные результаты идентификации, исключая возможность путаницы или ошибочной классификации.

На основании проведенных исследований было определено, что выделенный штамм микроорганизма принадлежит к следующим систематическим группам: Домен: Bacteria; Тип: Firmicutes; Класс: Bacilli; Порядок: Bacillales; Семейство: Bacillaceae; Род: *Bacillus*; Вид: *Bacillus subtilis*.

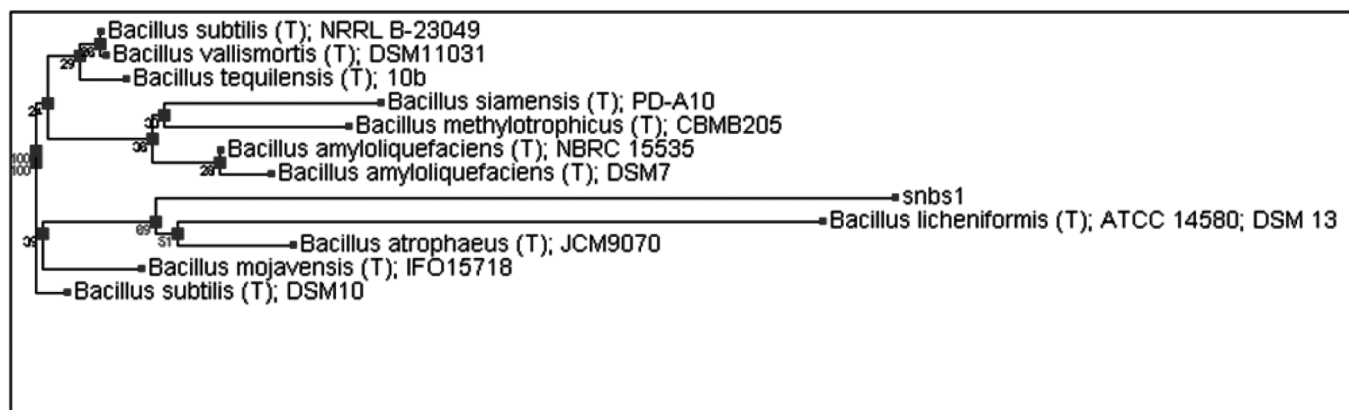


Рис. 2. Филогенетическое дерево выделенного штамма

Эти идентификационные характеристики позволяют точно классифицировать штамм и определить его систематическое положение в бактериальной таксономии.

Оценка степени деградации нефти показала, что штамм *Bacillus subtilis* проявляет высокую активность в области утилизации нефтезагрязнений (+++). Это свидетельствует о его значительном потенциале в биореме-

диации и использовании в процессах очистки нефтяных загрязнений. Полученные результаты подтверждают положительные характеристики штамма *Bacillus subtilis* и его важность в решении проблемы нефтезагрязнения. Однако, важно отметить, что дальнейшие исследования и эксперименты необходимы для полного понимания его потенциала и оптимизации его использования в практических целях.

ЛИТЕРАТУРА

- Оборин А.А., Калачникова И.Г., Масливец Т.А., Базенкова Е.И., Плещеева О.В., Оглоблина А.И. // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М.: Наука, 1988. — С. 140–159.
- Оборин А.А., Хмурчик В.Т., Иларионов С.Л., Маркарова М.Ю., Назаров А.В. Нефтезагрязненные биоценозы. — Пермь, 2008. — 511 с.
- Саркисов С.В. Экология: учебник. — СПб.: ВИ (ИТ) ВА МТО, 2015 — 360 с.
- Ерофеевская Л.А. Разработка способа очистки мерзлотных почв и грунтов от нефтезагрязнений в природно-климатических условиях Якутии: диссертация... кандидата биологических наук: 03.02.08 / Ерофеевская Лариса Анатольевна: [Место защиты: ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»], 2018. — 248 с. Дата публикации в реестре: 2020-03-03T18:35:26Z.
- Kovyazin V.F., Lepikhina O.Yu., Demidova P.M., Kolesnik O.A., Shobairi S.O.R., Nguyen A.T. Problems of forest resource management in the Arctic zone of the Russian Federation. — Russian Forestry Journal, 2023. — № 3. — С. 185–194.
- Ерофеевская Л.А., Глянцева Ю.С. Формирование консорциума углеводородокисляющих микроорганизмов для очистки почв от нефтезагрязнений в природно-климатических условиях Якутии // Естественные и математические науки в современном мире: сб. ст. по матер. XVII междунар. науч.-практ. конф. — Новосибирск: СибАК, 2014. — № 4 (16). — С. 92–100.
- Erofeevskaia L.A., Salytkova A.L. Properties of strain *Pseudomonas panipatensis* [Электронный ресурс] // Бюллетень науки и практики (Bulletin of science and practice), 2016. — № 11 (12). — С. 54–60. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/properties-of-strain-pseudomonas-panipatensis> (дата обращения: 30.10.2023).
- Пат. 2617951 Российская Федерация, МПК С1, С12N1/20, В09С1/10, С02F3/34, С12R1/125. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* — деструктор нефти и нефтепродуктов [Текст] / Ерофеевская Л.А.; Салтыкова А.Л., Вит А.А.; заявитель и патентообладатель ООО МИП «СахаНефтеБиоСорб» — 2015157225/10; заявл. 31.12.15; опубл. 28.04.2017, Бюл. № 13 — 10 с. — <http://www.findpatent.ru/patent/261/2617951.html>

© Вит Алина Александровна (alina_vit@list.ru); Салтыкова Анастасия Леонидовна (ny94@list.ru);
Ерофеевская Лариса Анатольевна (lora-07.65@mail.ru); Далбаева Елена Александровна (aselka@mail.ru)
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»