

Условия окружающей среды играют важную роль в процессе деградации ксенобиотиков микроорганизмами-деструкторами. Биодоступность и активность биодegradации соединения ограничивают следующие факторы:

1. Неоптимальное значение или отсутствие какого-либо фактора, необходимого для роста микроорганизмов-деструкторов:

- низкая концентрация ксенобиотика для индукции ферментов метаболизма;
- физическая недоступность загрязнения из-за его адсорбции, связывания, механического включения, низкой растворимости;
- недоступность акцепторов электронов или кофакторов;
- дефицит элементов питания;
- неоптимальные температура, влажность, pH, Eh и др.

2. Инактивация необходимых внеклеточных ферментов.

3. Токсическое действие окружающей среды, обусловленное токсичностью ксенобиотика или органическими ингибиторами, генерируемыми другими биологическими системами, а также токсинами микроорганизмов.

## 1.2. Микроорганизмы-деструкторы

Основная роль в биодеструкции органических загрязнителей принадлежит микроорганизмам, особенно бактериям, синтезирующим разнообразные ферментные системы. К микроорганизмам-деструкторам относят значительную часть от всего микробиоценоза (рис. 2), доля деструкторов еще больше в искусственно созданных экосистемах, направленных на очищение сред — аэротенках, метантенках, полях фильтрации и др.

В настоящее время известно большое количество видов микроорганизмов, принадлежащих к зубактериям, дрожжам, грибам, способных к утилизации нормальных и разветвленных, насыщенных и ненасыщенных углеводов, циклических углеводов, ПАУ, ПАВ, пестицидов, галогенорганических соединений. Микроорганизмы — деструкторы органических загрязнителей известны среди представителей родов бактерий *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Azotobacter*, *Bacillus* (рис. 3), *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Zooglea*, *Nocardia*, дрожжей *Yarrowia*, *Candida*, *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, грибов *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Verticillium*, *Alternaria*, *Fusarium*.



Рис. 2. Микробное разнообразие почвенной экосистемы, включающее биодеструкторы (агаризованная питательная среда)

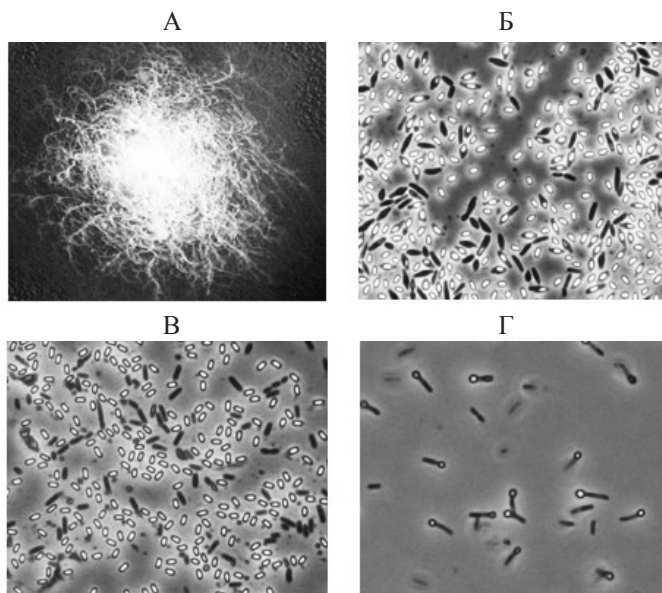


Рис. 3. Обитатели водных и почвенных экосистем — представители спорообразующих бактерий рода *Bacillus*:

А — колония на поверхности агаризованной среды;

Б – Г — клетки и споры (фазово-контрастная микроскопия)

Известны деструкторы среди цианобактерий: *Agmenellum*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Microcoleus*, *Phormidium*, *Nostoc*. Но цианобактерии не способны к полной минерализации загрязнителей, их роль заключается в синтезе полисахаридов, способствующих образованию эмульсии ПАУ, других нефтепродуктов и загрязнителей в воде, что является первым шагом к биодеструкции. Продуцируемые цианобактериями внеклеточные полисахариды привлекают бактериальные клетки, формирующие разнообразную сопутствующую микробиоту. Ассоциативные с водорослями бактерии, цианобактерии входят в альгобактериальное сообщество, функционирующее как надорганизменная система, что способствует более эффективной биодegradации ксенобиотиков (рис. 4).

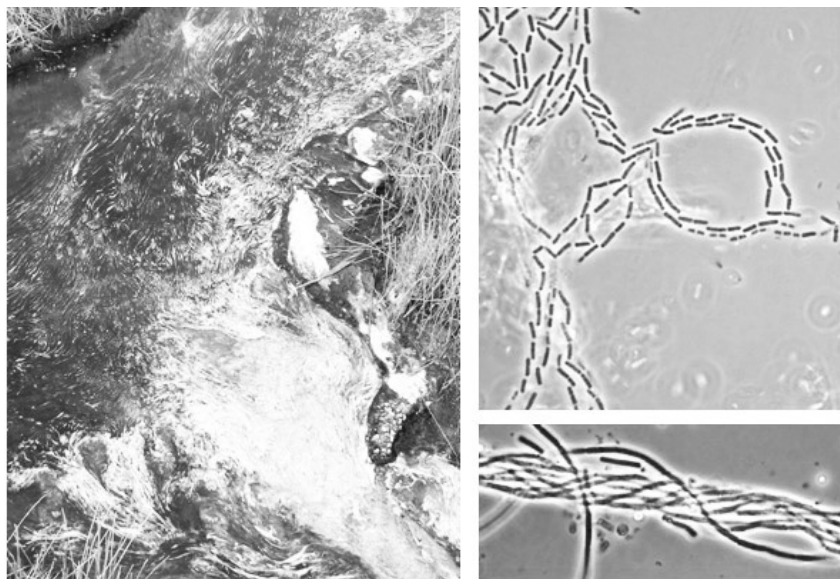


Рис. 4. Альгобактериальное сообщество микробного мата (слева) и входящие в его состав бактерии (справа)

Смешанные популяции, как правило, быстрее и полнее разрушают многие синтетические соединения. Это характерно для ситуации, когда отдельный вид организмов трансформирует одно соединение в другое, но не имеет ферментативной системы для его дальнейшей де-

градации. Этой способностью обладает другой организм, в результате соединения разлагается полностью.

Способность к биодеструкции в биоценозе зависит от состава и разнообразия фито-, микроценоза, скорости роста организмов, обмена питательными веществами и генетическим материалом. Накапливаемые метаболиты могут быть токсичны для одного компонента сообщества и усваиваться другими микроорганизмами, что ускоряет в совокупности процесс разложения (феномен детоксификации).

Самоочищение природных экосистем от загрязнителей с помощью микроорганизмов подтолкнуло к их выделению и дальнейшему усовершенствованию с целью направленного использования для биодеструкции конкретных ксенобиотиков. Разработка таких биологических способов очистки на основе штаммов-деструкторов способна существенно интенсифицировать процессы восстановления природной среды. Эффективность селекции микроорганизмов-деструкторов повышается, если придерживаться следующих принципов:

- выделять монокультуры или сообщества микроорганизмов (изоляты) из сред, загрязненных теми или иными ксенобиотиками;
- использовать биологический агент, изолированный из той же загрязненной природной или техногенной среды, для очистки которой он предназначен;
- выделять микроорганизмы из мест с застарелыми загрязнениями или с неоднократным поступлением ксенобиотиков. В этом случае велика вероятность, что число организмов, деградирующих ксенобиотик, увеличилось под действием естественного отбора. Для выделения таких изолятов эффективен метод накопительных культур;
- накапливать биологический материал для деградации вещества-загрязнителя лучше всего на этом же субстрате либо на его легко утилизируемых аналогах;
- использовать уже известные штаммы-деструкторы (музейные культуры) или на базе существующих конструировать рекомбинантные штаммы.

Существует *два* принципиальных *подхода к биодegradации ксенобиотиков* и восстановлению экосистем:

1. Активизация аборигенной микробиоты путем создания оптимальных условий для ее развития. Этот вариант подходит для участков с застарелыми загрязнениями, где почти всегда обитает дикая микробиота, способная трансформировать загрязнитель. Очистка в

этом случае происходит *in situ* (по месту) без внесения биопрепаратов и зависит от условий окружающей среды и свойств загрязнителя.

2. Введение в загрязненную экосистему активных микроорганизмов-деструкторов в виде биопрепаратов. Такой способ необходим в случае, если самоочищающая способность экосистемы угнетена токсикантом или условия неблагоприятны (например, свежие разливы нефти в северных регионах с суровым климатом).

Кроме селектирования штаммов, перспективно получение рекомбинантных микроорганизмов методами **генной инженерии**. Способность микроорганизмов разрушать ксенобиотик или другой поллютант зависит от наличия в клетках генов, определяющих синтез ферментов, участвующих в деградации соединения. Конструирование рекомбинантных штаммов — деструкторов ксенобиотиков заключается в объединении нескольких генов или их блоков, ответственных за первичный метаболизм соединений. Преимущество такого объединения состоит в том, что генетически модифицированные микроорганизмы могут синтезировать различные ферментные системы, что позволяет эффективно и быстро разрушать широкий спектр химических загрязнений. Генетическая модификация позволяет повысить устойчивость микроорганизмов к неблагоприятным факторам среды, придать им новые важные для практического применения свойства. Например, внедрив гены синтеза био-ПАВ, можно расширить спектр биодоступных гидрофобных контаминантов.

Гены бактерий, ответственные за деградацию, находятся в хромосомах (гены центрального метаболизма) или сосредоточены во внехромосомных элементах — катаболических плаزمидах, плазмидах деградации (гены периферийного метаболизма). В генной инженерии бактериальные плазмиды используют в качестве векторов с целью передачи части генетического материала от хозяина (клетки донора) в клетки реципиента. Они представляют собой саморегулирующиеся кольцевые двунитевые молекулы ДНК и способны стабильно и автономно существовать в клетке в характерном для каждого типа плазмид числе копий. Саморепликация плазмиды осуществляется с помощью ферментных систем клетки-хозяина. Плазмиды относятся к подвижным элементам (векторам), т. е. способны к внутривидовому переносу между клетками популяции, клетками различных видов и родов микроорганизмов.

Новые сочетания генов, получаемые в результате внутри- и межплазмидной рекомбинации, между плазмидой и хромосомой хозяина, могут приводить к возникновению новых комбинаций генов и распространению катаболических путей деградации, кодируемых плазмидами (модулярная эволюция).

Поскольку кольцевая хромосома бактерий содержит ограниченное количество генов, она обеспечивает основной метаболизм бактерий, их развитие в благоприятных условиях. При изменении условий выживание популяций бактерий обеспечивается наследственными элементами в форме подвижных, легко передаваемых структур, которые кодируют биосинтез ферментов, необходимых для существования бактерий в изменившихся условиях обитания. Например, один из выделенных штаммов бактерии *Pseudomonas* оказался способным использовать более 100 видов органических соединений. Бактериальная хромосома не может содержать все гены, ответственные за синтез ферментов, необходимых для деградации такого большого количества соединений. Очевидно, что в этом случае метаболизм большинства соединений осуществляется при участии ферментов, кодируемых плазмидами.

Плазмиды обладают изменчивой структурой и существуют в стабильной форме только в том случае, если этому способствуют условия среды. Например, когда с определенной плазмидой связана катаболическая функция, присутствие субстрата-ксенобиотика стабилизирует ее структуру в процессе популяционной автоселекции. При отсутствии селективного давления (ксенобиотика) автономные плазмиды быстро элиминируются, но стабильны после включения их в хромосому. Особенности генетического аппарата бактерий и механизмы горизонтального переноса генов обеспечивают необходимую пластичность генома и включения в метаболизм ксенобиотиков, адаптацию к различным соединениям и быстрое распространение необходимых генов внутри популяции.

Некоторые плазмидные системы хорошо изучены, например, контролирующие окисление толуола, о-, м-, п-ксилолов, нафталина, 3-хлорбензоата, 2,4-дихлорфеноксиацетата. Системы биодеградации таких соединений, как камфора и n-алканы, изучены недостаточно из-за очень больших размеров соответствующих плазмид (до 500 тыс. пар нуклеотидов).

В 1970 г. был создан первый бактериальный штамм, способный расщеплять большинство углеводов нефти, который был назван «супербацилла». Для его получения использовали плазмиды, каждая из которых кодировала фермент, расщепляющий определенный класс углеводов (рис. 5).

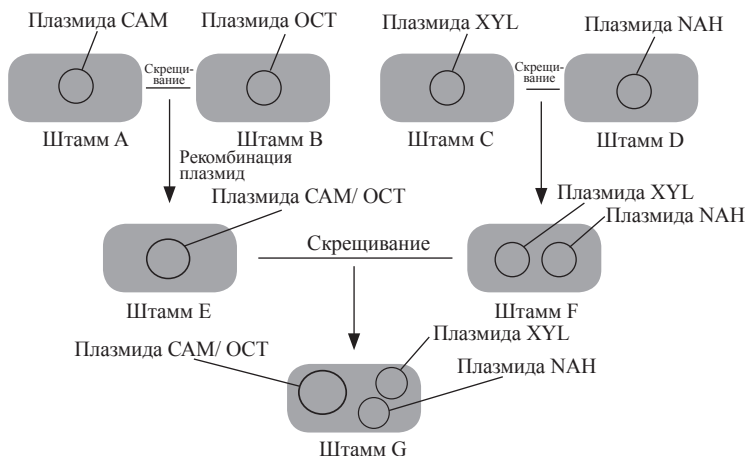


Рис. 5. Схема создания бактериального штамма, способного разрушать камфару, октан, ксилол и нафталин [Глик, Пастернак, 2002]

Штамм А, несущий плазмиду САМ (детерминирует разрушение камфары), скрещивают со штаммом В, несущим плазмиду ОСТ (разрушение октана), при этом образуется штамм Е, который содержит гибридную плазмиду, образовавшуюся в результате гомологичной рекомбинации между исходными плазмидами и обладающую функциями каждой из них. Штамм С, содержащий плазмиду ХУЛ (разрушение ксилора), скрещивают со штаммом D, содержащим плазмиду НАН (разрушение нафталина), и получают штамм F, который несет обе эти плазмиды. Наконец, скрещивают штаммы Е и F, в результате чего образуется штамм G, содержащий плазмиды САМ/ОСТ, ХУЛ и НАН.

Объединение разных метаболических путей в одном микроорганизме с помощью конъюгации — это лишь один из способов создания бактерий с новыми свойствами. Можно расширить их катаболические возможности, модифицируя гены, кодирующие ферменты

того или иного метаболического пути. Совершенствование какого-либо катаболического пути возможно с помощью технологии рекомбинантных ДНК, традиционного мутагенеза и соответствующих методов отбора.

Благодаря плазмидам как объектам генной инженерии с помощью рестриктаз возможно *in vitro* сконструировать *de novo* геном клетки, передать его в клетки реципиентов конъюгацией, трансформацией или трансдукцией и при включении в клетку большого числа плазмидных копий увеличить число необходимых генов. В последнее время созданы банки векторов и носителей, позволяющие конструировать штаммы, способные к биодеструкции ксенобиотиков при различных условиях среды и содержащие не только гены деструкции, но и, например, гены синтеза био-ПАВ или фермента люциферазы, что улучшает биодоступность ксенобиотиков и облегчает наблюдение за рекомбинантными штаммами в окружающей среде.

Недостатком в конструировании микроорганизмов является нестабильность систем «хозяин — вектор», что затрудняет интродукцию штаммов в естественную среду. При возвращении микроорганизма с новой катаболической функцией в исходную природную среду ему приходится конкурировать с хорошо адаптированной к данным условиям среды естественной микробиотой, сталкиваясь с огромным разнообразием источников углерода, в том числе высокотоксичных.

В микробной утилизации поллютантов принципиальное значение имеют выживаемость и конкурентоспособность микроорганизмов-деструкторов, интродуцируемых в места загрязнения *in situ*. Использование катаболических генов представляется перспективным направлением биоремедиации, поскольку даже в том случае, если интродуценты неконкурентоспособны и постепенно элиминируются, тем не менее они могут быть донорами генов биodeградации вследствие конъюгационного переноса плазмид. Катаболические плазмиды с генами, кодирующими биохимические пути микробной деградации поллютантов, и другие мобильные генетические элементы, способные повышать эффективность штаммов-деструкторов за счет приобретения ими новых катаболических способностей, являются позитивным фактором, который при продуманном использовании может способствовать решению ряда экологических проблем.



## **2 ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ОТДЕЛЬНЫХ КЛАССОВ ОРГАНИЧЕСКИХ КСЕНОБИОТИКОВ**

---

### **2.1. Разложение нефти и нефтепродуктов**

Одни из наиболее опасных загрязнителей на Земле — нефть, нефтепродукты и нефтесодержащие отходы, ежегодное попадание которых в окружающую среду оценивается в сотни миллионов тонн. В результате интенсивного транспорта нефти к местам ее потребления, а также в условиях сурового климата, характерного для мест ее добычи и приводящего к быстрому износу и порывам нефтепроводов и емкостей для хранения, аварии и масштабные разливы нефти стали уже привычным явлением.

Повышенные концентрации нефти и нефтепродуктов в почве и воде нарушают дыхательную активность почвы и микробное самоочищение почвенных и водных ресурсов. Изменяя соотношения между отдельными группами почвенных микроорганизмов, крупные нефтяные загрязнения меняют направление почвенного метаболизма, подавляют процессы дыхания, азотфиксации, нитрификации, биodeградации целлюлозы, приводят к накоплению трудноокисляемых продуктов.

Удаление нефти и ее составляющих из контаминированных зон определяется совокупностью абиотических и биотических процессов.

Естественные процессы самоочищения и восстановления почв, загрязненных нефтью, протекают достаточно медленно, особенно при высоких уровнях загрязнения. В первые недели после загрязнения почвы нефтью происходят в основном физические процессы миграции и рассеивания углеводородов в результате испарения и выщелачивания. Скорость испарения различна и зависит от свойств сре-

ды, метеорологических условий, а также от состава нефти. Сначала испаряются фракции с точкой кипения ниже температуры 370 °С. Потери нефти вследствие испарения нефтяных масел и сырой нефти в южных регионах составляют до 40–70 %. В северной климатической зоне испаряется значительно меньше нефти, в почве она может сохраняться десятки лет, и преобладает рассеивание ее циркулирующими водами.

В результате испарения нефти возрастает вязкость ее оставшейся части и замедляется скорость миграции, увеличивается количество углеводородов с длиной цепи более  $C_{20}$ , ароматических и циклических углеводородов, так как испаряются в основном низкомолекулярные углеводороды. В результате удаления наиболее токсичных легких углеводородов уменьшается вредное действие оставшейся смеси на микроорганизмы-деструкторы, что облегчает последующую микробиологическую деградацию, а также повышается доля компонентов, наименее летучих и растворимых, т. е. более стойких к разложению.

Пленка углеводородов на водной и почвенной поверхности может подвергаться химическому воздействию вследствие образования свободных радикалов как результат термического или фотохимического возбуждения. Этот процесс более существенен в водных средах и зонах с засушливым и жарким климатом и менее — в большинстве почв умеренного и холодного климата. В первом случае преобладают фотохимическое окисление, испарение и последующее механическое разрушение и рассеивание, в результате чего за 2–3 года происходит самоочищение контаминированных сред.

Проникновение нефти в почву приводит к расширению площади и увеличению глубины загрязнения. При легком механическом составе почв, например, супесчаных и суглинистых, легкие фракции нефти и нефтепродуктов могут проникать на глубину 1,5–2 м, подавляя биологическую активность почв. По мере удаления от источника загрязнения соотношение между основными формами миграции меняется, при этом повышается доля растворенных, эмульгированных, сорбированных нефтепродуктов.

Через 1–4 нед после попадания нефтяных углеводородов в окружающую среду в благоприятных условиях для роста микрофлоры начинается биodeградация загрязнения.

Существуют *два* принципиальных *подхода к биодegradации нефтяных углеводородов в естественной среде*:

1. Стимуляция природной нефтеокисляющей микробиоты путем создания оптимальных условий для ее развития (внесение азотно-фосфорных удобрений, аэрация и т. п.).

2. Введение в загрязненную экосистему активных углеводородо-окисляющих микроорганизмов.

В настоящее время известно более 100 видов микроорганизмов, принадлежащих к 40 родам эубактерий, дрожжей, грибов, способных к утилизации углеводородов. Практически все углеводороды, входящие в состав нефти, могут быть объектом микробиологического воздействия, претерпевая разнообразные пути превращения. Углеводороды в почве разлагаются в результате деятельности углеводородо-окисляющих микроорганизмов, способных окислять их до  $\text{CO}_2$  и воды или превращать в соединения, утилизируемые другими микроорганизмами.

По степени снижения окисляемости микроорганизмами компоненты нефти и нефтепродуктов располагаются в такой последовательности:

алифатические > ароматические > смолы > асфальтены (почти не окисляются).

Наиболее активно утилизируются углеводороды с прямой цепью, н-парафины с длиной цепи  $\text{C}_{12}$ – $\text{C}_{22}$ . В зависимости от условий они разлагаются на 10–90 % в течение 1–2 мес при первоначальном суммарном содержании нефтяных углеводородов 0,5–2 %. Большинство микроорганизмов не ассимилируют н-алканы, содержащие в цепочке менее 9 атомов углерода. К их окислению способны бактерии родов *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*. Низкомолекулярные н-алканы обычно угнетают развитие микробного сообщества, однако вследствие летучести их действие непродолжительно; н-алканы с длиной цепи более  $\text{C}_{20}$  при температуре окружающей среды представляют собой вязкие жидкости либо твердые вещества, поэтому транспорт их к клеткам затруднен. В смеси с н-алканами с меньшей длиной цепи они находятся в виде жидкости и потребляются относительно легко.

Более устойчивы к окислению изоалканы, циклоалканы и ароматические углеводороды. Многие из них в виде моносубстратов не по-

требляются микроорганизмами, разлагаясь в режиме соокисления с другими более доступными углеводородами.

На степень и скорость разложения углеводов влияет агрегатное состояние, в котором они присутствуют в среде. Для водных сред важна растворимость углеводов в воде, поскольку растворимые молекулы лучше транспортируются к клеткам микроорганизмов. Растворимость углеводов низкая и уменьшается с увеличением их молекулярной массы. Насыщенный раствор тетрадекана ( $C_{14}$ ), например, имеет концентрацию  $1 \cdot 10^{-6}$  мг/л. На скорость окисления влияет также степень дисперсности углеводов в воде. Транспорт их в клетку происходит непосредственно при контакте эмульгированной углеводородной фазы с поверхностью клеток. Дисперсность можно повысить механическим воздействием или с помощью детергентов. Многие микроорганизмы способны продуцировать ПАВ, эмульгирующие углеводороды и ускоряющие их окисление.

Способность микроорганизмов продуцировать внеклеточные эмульгирующие агенты является ключевой в биodeградации нефти. Сплошная пленка нефти под действием биоэмульгаторов микроорганизмов разбивается на отдельные сферические структуры, более доступные для внеклеточных ферментов и транспортировки отдельных компонентов внутрь клетки (рис. 6).

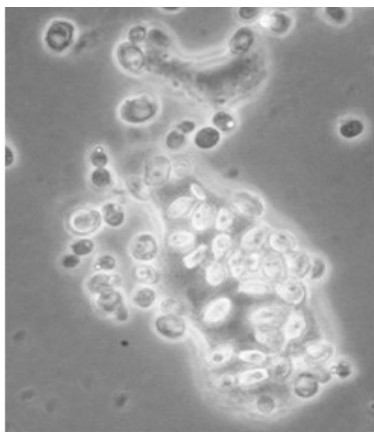


Рис. 6. Клетки дрожжевого штамма *Yarrowia lipolytica* на поверхности микрокапель нефти в процессе биоэмульгации (фазово-контрастная микроскопия)

Активные биоэмульгирующие комплексы способны образовывать бактерии *Rodococcus* (рис. 7), *Acinetobacter*, дрожжи *Yarrowia lipolytica* и другие микроорганизмы.

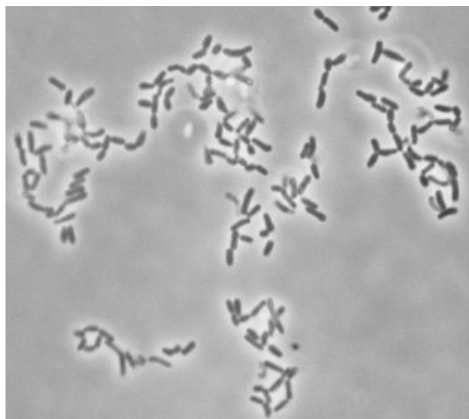


Рис. 7. Клетки бактериального штамма *Rodococcus* (фазово-контрастная микроскопия)

Биодеградация тяжелых фракций нефти, содержащих смолы и асфальтены, затруднена устойчивостью к воздействию ферментов и малой способностью диспергироваться в жидкой среде. Тяжелые фракции нефти содержат большое число полиароматических соединений с конденсированными ядрами, из них относительно биодеградируемы только соединения с тремя и четырьмя ароматическими кольцами. Время полураспада этих соединений варьирует от 3 до 2000 нед. Для почвенной среды средние скорости минерализации тяжелых фракций нефти, ила и сырых остатков варьируют между 0,02–0,6 г углеводов на 1 кг почвы в сутки. В подпочвенных горизонтах скорость разложения даже наиболее доступных фракций нефти составляет 0,01–0,02 г/кг в сутки, т. е. меньше, чем на поверхности. За год в субтропиках биодеградируется около 40 % нефти, оставшейся в почве после фотохимического разложения и испарения. В условиях холодного климата биодеградация нефти вследствие низкой активности естественных процессов может длиться десятки лет. При благоприятных условиях основной процесс биодеструкции может протекать за 3–4 нед, при этом численность углеводородоксиля-

ющих микроорганизмов увеличивается в 100–1000 раз, изменяется и численность других гетеротрофных микроорганизмов.

Заключительный и самый длительный этап в разложении нефти связан с трансформацией оставшихся высокомолекулярных соединений и образованием связанных остатков. Небольшая часть компонентов нефти, находясь в почве, полимеризуется с образованием асфальтенов и полиароматических углеводородов. Эта часть устойчива к биологическому окислению. Чем более застарелое загрязнение, тем выше ее доля (от 1 до 20 %). В силу инертности новые высокомолекулярные соединения и связанные остатки мало опасны для окружающей среды. Таким образом, в совокупности физическая и химическая трансформация, биodeградация и образование связанных остатков приводят к устранению вредного действия нефти, попавшей в окружающую среду.

Максимальное содержание нефти в среде, доступное для биоремедиации, не превышает 5–10 % (по массе).

К наиболее важным факторам, от которых зависит скорость биodeградации, относится температура. Для биodeградации углеводородов оптимальная температура +30...+40 °С, однако существуют микроорганизмы, способные окислять углеводороды как при более высоких, так и при более низких положительных температурах. Углеводороды с большой длиной цепи утилизируются при температуре не ниже 25 °С.

Оптимальное содержание влаги в почве для микроорганизмов-нефтедеструкторов 50–80 %. При меньшей влажности осмотические и матричные силы ограничивают доступность воды и, следовательно, лимитируют их рост. Однако в переувлажненных почвах снижение газового пространства затрудняет доступ кислорода. В почвах, загрязненных нефтью, водный баланс значительно нарушается из-за гидрофобности ее соединений.

Окисление углеводородов микроорганизмами происходит в аэробных условиях. Углеводороды нефти — это полностью восстановленные соединения, и первым этапом их окисления является включение кислорода в их молекулу, поэтому при окислении углеводородов кислород выполняет как функцию источника питания, так и функцию акцептора электронов в катаболических процессах.

После первичного окисления углеводородов разложение может продолжаться и в аэробных, и в анаэробных условиях. Денитри-

фикаторы и сульфатредукторы, как правило, плохо окисляют исходные углеводороды, а содержание сульфатов и нитратов в природных средах незначительно, поэтому кислород часто лимитирует деградацию углеводородов. Для поддержания аэробных условий при ремедиации почв, загрязненных нефтью, их периодически рыхлят. Денитрификация и сульфатредукция могут играть существенную роль на стадии разложения промежуточных продуктов окисления углеводородов (жирных кислот, фенолов, продуктов их расщепления) и в центральных зонах почвенных агрегатов. Здесь возможны процессы с восстановлением  $Fe^{3+}$  и брожения.

Адсорбция нефти и нефтепродуктов на поверхности почвенных частиц затрудняет их биодеструкцию вследствие образования крупных и плотных агломератов. В переувлажненной почве на почвенных частицах образуются рыхлые структурированные агрегаты, через поры которых увеличивается поступление кислорода и повышается скорость деградации углеводородов.

Для утилизации углеводородов нефти бактериями наиболее благоприятен нейтральный pH (от 6,5 до 8,0). Оптимальное развитие грибов и дрожжей происходит в кислой среде, в широком диапазоне pH развиваются смешанные популяции.

Минеральных компонентов в нефтяных загрязнениях содержится мало, кроме того, природные среды, особенно в северных регионах, обеднены источниками азота и фосфора. Как правило, при загрязнении нефтью дефицит биогенных элементов является лимитирующим фактором активности микроорганизмов-нефтедеструкторов. Для биологической очистки и биоремедиации вносят минеральные компоненты в виде минеральных удобрений (азотных, фосфорных и др.). Оптимальное соотношение C : N составляет 9–200 : 1. Большинство минеральных удобрений хорошо растворяется в воде, что обеспечивает доставку компонентов минерального питания к микроорганизмам. При исчерпании источников азота дальнейшее окисление углеводородов в почве может поддерживаться азотом, поставляемым азотфиксаторами.

Для почв с застарелыми нефтяными загрязнениями или при их повторном появлении характерно присутствие микроорганизмов-нефтедеструкторов («диких» или аборигенных). В этом случае для активизации углеводородоокисляющей способности аборигенной микрофлоры достаточно провести агротехнические мероприятия. При

ликвидации свежих нефтяных проливов в среду необходимо вносить препараты микроорганизмов-деструкторов. На основе моно- и смешанных культур разработано и активно используется огромное число биопрепаратов, предназначенных для очистки природных и техногенных сред. В экстремальных условиях (в кислой среде, при дефиците влаги, ограничении в питательных веществах) как деструкторы нефти более эффективны дрожжи и грибы. Мицелиальный рост позволяет грибам распространяться между локальными источниками компонентов питания, проникать в почвенно-нефтяные агломераты и в совокупности с устойчивостью к низкому содержанию влаги и низкому рН обеспечивает их активность на поздних стадиях разложения остатков нефти.

В разложении нефти наряду с микроорганизмами косвенно могут участвовать растения и животные. При попадании нефти в почву возможно ограничение роста растений и активности почвенных животных, что, в свою очередь, может влиять на микробную активность. Разрыхление почвы корнями растений, земляными червями и роющими артроподами облегчает дренаж и проникновение газов. Кроме того, роющие животные могут транспортировать органический материал к биологически активным поверхностным слоям почвы.

По сравнению с другими вредными веществами загрязнение углеводородами в большей степени влияет на макрофлору и макрофауну, на эстетическое восприятие окружающей среды и оказывает воздействие на микробную составляющую биоты. Микрофлора реагирует на изменения и способствует восстановлению окружающей среды, однако этот процесс может длиться довольно долго. Цель биоремедиации — ускорить его.

В настоящее время биологические методы восстановления загрязненных углеводородами природных объектов (микробиологические и фиторемедиация) справедливо признаны наиболее безопасными для окружающей среды и экономически целесообразными. Использование биопрепаратов, созданных на основе ассоциаций культур-нефтедеструкторов, способных окислять широкий спектр углеводородов нефти (от длинноцепочечных алканов до полиароматических соединений), позволяет рекультивировать нефтезагрязненные территории. Биопрепараты (табл. 1) предназначены для очистки от нефти и нефтепродуктов, для восстановления функций самоочищения почвы и водоемов, очистки сточных вод промышленных предприятий, сто-



ков автомоек, СТО, АЗС, территорий нефтедобывающей и нефтеперерабатывающей промышленности, депарафинизации скважин, технических резервуаров. Широкое применение для очистки от нефтезагрязнений находят препараты Путидойл, Деградойл и др. В состав этих препаратов входят монокультуры (Путидойл, Экойл, Дестройл и др.) или ассоциации с двумя и более чем двадцатью видами различных нефтеокисляющих микроорганизмов: бактерий, грибов, дрожжей (Деворойл, Simbinal, Родоторин).

Таблица 1

**Коммерческие препараты для биоремедиации на основе нефтеокисляющих микроорганизмов**

Препарат	Входящие в его состав микроорганизмы
Деградойл	<i>Azotobacter vinelandii</i>
Путидойл	<i>Pseudomonas putida</i>
Экойл	<i>Pseudomonas sp.</i>
Эконадин	<i>P. fluorescens</i>
Дестройл	<i>Acinetobacter sp.</i>
Деворойл	<i>Rhodococcus sp.</i> (два вида), <i>P. aeruginosa</i> , <i>Candida sp.</i>
БАК	<i>Rhodococcus sp.</i> (несколько штаммов)
Десна	<i>Bacillus megaterium</i>
Бацисперин	<i>Bacillus sp.</i>
Simbinal	<i>Aeromonas sp.</i> , <i>Arthrobacter globiformis</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Citrobacter sp.</i> , <i>Flavobacterium tirrenicum</i> , <i>Nocardia sp.</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>Aspergillus candidus</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>A. Terreus</i> , <i>Penicillium frequentans</i>
Родоторин	Комплекс грибов и бактерий на сорбентах — капроне и полистироле

С помощью методов генной инженерии стало возможным создание рекомбинантных микроорганизмов на основе природных с целью получения штаммов с наиболее ценными свойствами. Так, в геном микроорганизмов могут быть клонированы гены, белковые продукты которых обуславливают биodeградацию крайне токсичных ароматических соединений. Катаболические плазмиды с генами, ко-

дирующими биохимические пути микробной деградации поллютантов, и другие мобильные генетические элементы способны повышать эффективность штаммов-деструкторов за счет приобретения ими новых катаболических способностей.

## 2.2. Биodeградация ПАВ

*Поверхностно-активные вещества* — химические соединения, способные адсорбироваться на поверхности раздела фаз «жидкость — твердое тело», «жидкость — газ», «жидкость — жидкость» и т. д. и существенно изменять физико-химические системы, в первую очередь поверхностное (межфазное) натяжение. Классификация ПАВ, принятая на III Международном конгрессе по ПАВ и рекомендованная Международной организацией по стандартизации (ISO) в 1960 г., основана на химической природе молекул и включает четыре основных класса ПАВ: анионактивные, катионактивные, неионогенные и амфотерные.

Мировое производство ПАВ составляет 2–3 кг на душу населения в год. Примерно 50 % производимых ПАВ используется для бытовой химии (моющие и чистящие средства, косметика), остальное — в промышленности и сельском хозяйстве. ПАВ находят применение более чем в 100 отраслях народного хозяйства. К крупным потребителям ПАВ относятся нефтяная и химическая промышленности, промышленность строительных материалов и ряд других. Одновременно с ежегодным ростом производства ПАВ соотношение между их применением в быту и промышленности изменяется в пользу последней. Широкое использование ПАВ в различных технологических процессах обуславливает накопление их в сточных водах, почве, отходах производств.

Предельно допустимая концентрация ПАВ в воде водоемов составляет 0,5 мг/дм<sup>3</sup>, неионогенных — 0,1 мг/дм<sup>3</sup>. Попадая в водоемы и водотоки, ПАВ оказывают значительное влияние на их физико-биологическое состояние, ухудшая кислородный режим и органолептические свойства, и сохраняются там долгое время, так как разлагаются очень медленно. Сточные воды, содержащие продукты гидролиза полифосфатных ПАВ, могут вызвать интенсивный рост растений, что приводит к загрязнению ранее чистых водоемов: по мере отмирания растений начинается их гниение, а вода обедняется кислородом,

что, в свою очередь, ухудшает условия существования других форм жизни в воде. Отрицательное с гигиенической точки зрения свойство ПАВ — их высокая пенообразующая способность. Хотя ПАВ не являются высокотоксичными веществами, имеются сведения о косвенном их воздействии на гидробионты. При концентрациях 5–15 мг/дм<sup>3</sup> рыбы теряют слизистый покров, при более высоких концентрациях может наблюдаться кровотечение жабр. Попадая внутрь живых организмов, у высших животных и человека ПАВ вызывают генетические нарушения, снижают иммунитет, способствуют возникновению злокачественных опухолей. Для микроорганизмов токсичная доза 0,8–4,0 мг/дм<sup>3</sup>, для водорослей — 0,5–6,0, для беспозвоночных — 0,01–0,9 мг/дм<sup>3</sup>. Поэтому в настоящее время большую актуальность приобретают исследования, направленные на создание эффективных методов очистки окружающей среды от загрязнения поверхностно-активными веществами.

Среди способов очистки сточных вод в отстойниках — перевод ПАВ в пену, адсорбция активным углем, использование ионообменных смол, нейтрализация катионактивными веществами и другие, однако эти методы дороги и недостаточно эффективны. Главными факторами понижения концентрации ПАВ являются процессы биохимического окисления, сорбция взвешенными веществами и донными отложениями. Степень биохимического окисления ПАВ зависит от их химического строения и условий окружающей среды.

Биодеградация — основной процесс удаления ПАВ из водных и почвенных природных сред. По отношению к этому процессу все поверхностно-активные вещества принято делить на три группы:

1) легкоокисляемые, или так называемые биологически мягкие анионные ПАВ, — алкилсульфат и хлорсульфанол. Эти вещества сравнительно легко окисляются микроорганизмами. В аэротенках очистных сооружений они разлагаются на 80 %, в почве летом — от нескольких суток до 1 мес, зимой — в течение 3–4 мес;

2) трудноокисляемые, или биологически жесткие ПАВ, типа сульфанолюв НП-1 и НП-3;

3) вещества с промежуточной степенью доступности для биодеградации.

При попадании в водную среду и почву молекулы ПАВ подвергаются деструкции в результате биохимических и физико-химических

процессов и «потребляются» (разрушаются) микроорганизмами, присутствующими в воде, почве и активном иле.

По стадийности деструкции и потребления молекул ПАВ в процессе их биоразложения различают:

1) первичную биоразлагаемость — разрушение структуры молекулы с отщеплением гидрофильных групп, обуславливающее потерю поверхностно-активных свойств молекул ПАВ, что проявляется в первую очередь исчезновением пенообразования;

2) полную биоразлагаемость — дальнейшее усвоение осколков молекул ПАВ микробными сообществами вплоть до разложения на  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ .

В России действует **национальный стандарт ГОСТ Р 50595-93** «Вещества поверхностно-активные. Метод определения биоразлагаемости в водной среде», распространяющийся на метод определения биоразлагаемости поверхностно-активных веществ и устанавливающий условия, приемы и метод определения их биоразлагаемости как таковых, так и в составах бытовых и технических препаратов. Поверхностно-активные вещества при попадании в водную среду разлагаются с различной скоростью под воздействием физико-химических и биохимических факторов в зависимости от условий среды и вида ПАВ. Метод позволяет устанавливать кинетические характеристики процессов биоразложения ПАВ в аэробных условиях в водной среде, а также ориентировочно-допустимый уровень содержания ПАВ в сточных водах, подаваемых в аэротенки. Показатели биоразлагаемости ПАВ, определяемые по ГОСТ Р 50595-93, учитываются при санкционировании ассортимента, объемов производства и применения ПАВ, а также при выборе условий и способов очистки сточных вод. Метод основан на определении способности молекул ПАВ подвергаться биоразложению в аэробных условиях биологических очистных сооружений и водных объектов.

Биохимическое окисление ПАВ проводят как в естественных условиях на полях фильтрации, орошения и в биологических прудах, так и в искусственно созданных условиях — в биофильтрах и в аэротенках. Поля фильтрации, поля орошения и биофильтры функционируют за счет почвенных биоценозов; биологические пруды и аэротенки — за счет биоценозов водоемов.

В природных условиях процессы деструкции многих ПАВ происходят очень медленно и определяются уровнем загрязнения и видом

загрязняющего вещества, рН, температурой воды (чем выше температура, тем интенсивнее идет окисление), особенностями микробиоценоза, а в почве — типом и влажностью почвы, содержанием почвенного органического вещества, механическим составом. Для развития микроорганизмов, осуществляющих биоразложение ПАВ в почве, особенно большое значение имеют ее сорбционные свойства. В тяжелых почвах с высоким содержанием глинистых минералов и органического вещества ПАВ разлагаются значительно медленнее, чем в легких песчаных и супесчаных почвах.

В процессах трансформации и детоксикации анионных ПАВ в почве ведущая роль принадлежит бактериям родов *Pseudomonas* и *Bacillus*, которые могут адаптироваться к детергентам и использовать их в качестве единственного источника углерода. Активные деструкторы ПАВ встречаются также среди бактерий родов *Xanthomonas*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Achromobacter*.

Данные по биоразлагаемости ПАВ свидетельствуют о необходимости, с одной стороны, синтеза и внедрения в производство легко биоразрушаемых соединений, а с другой — о разработке новых, более интенсивных методов очистки окружающей среды от ПАВ. Эти методы должны основываться на использовании специально полученных высокоактивных чистых культур микроорганизмов — деструкторов ПАВ. Применение таких культур в микробном методе очистки будет способствовать защите окружающей среды от загрязнения синтетическими соединениями и сохранению окружающей человека природы.

### 2.3. Разложение ПАУ

Одна из важнейших причин современного экологического кризиса — все возрастающее химическое загрязнение окружающей природной среды. В ряду приоритетных загрязнителей находятся и полициклические ароматические углеводороды, являющиеся широко распространенными продуктами неполного сгорания ископаемых топлив и органических веществ. ПАУ в виде промышленных выбросов предприятий химической, нефтехимической промышленности, ливневого стока попадают в природные экосистемы, одним из важнейших элементов которых выступает почва. В загрязненных водных экосистемах ПАУ входят в пищевые цепи через биоаккумуляцию и