

Проблема загрязнения  
окружающей среды и способы  
её решения (Биоремедиация)

А.Е. Филонов

Лаборатория биологии плазмид  
ИБФМ РАН

# Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms



По данным отечественных исследователей ежегодное антропогенное поступление нефти в воды Мирового океана составляет 12-15 млн. т, при этом, примерно  $\frac{1}{3}$  его поверхности постоянно или временно покрыта нефтяной пленкой. До 30% загрязнений вод нефтью приходится на бытовые и промышленные отходы, 27% на суда, 12% на аварии танкеров и нефтяных платформ, но в тоже время 24% загрязнений Мирового океана поступает со дна из естественных источников.

Процесс естественного самовосстановления загрязненной среды является очень длительным. Согласно устоявшемуся мнению, восстановление загрязненных почв при уровне загрязнения 5000 мг/кг идёт от 2 до 30 лет. В северных регионах скорость этих процессов еще ниже. В связи с этим, последствия нефтяного загрязнения там сказываются многие десятилетия, поскольку период распада нефти и ее производных в условиях Севера составляет минимум 50 лет.

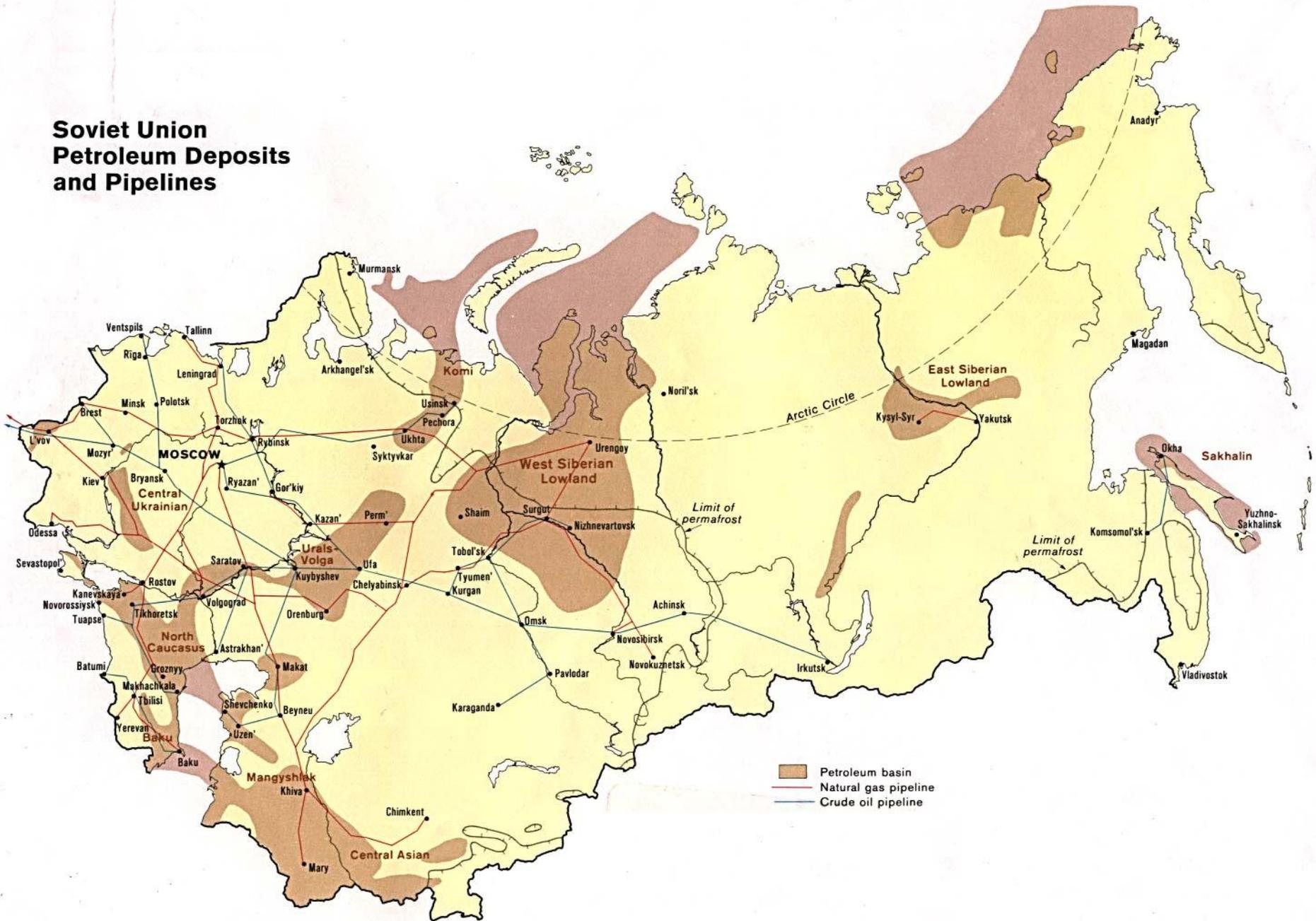
# Oil Contamination in Western Siberia

The view of  
oil-contaminated site.  
July, 1999



More than 200 000 hectares of land contaminated by oil up to 10 centimeters in depth were found in 1995 in Western Siberia oilfields alone, and the contamination enlarged on 700 000 hectares in 2003.

# Soviet Union Petroleum Deposits and Pipelines





© «Лукойл»





# Общие закономерности деградации углеводородов нефти.

Элементный состав нефти характеризуется обязательным наличием пяти химических элементов: углерода, водорода, кислорода, серы и азота. В количественном отношении преобладают первые два элемента – свыше 90%, максимальное содержание остальных трех элементов может в сумме достигать 5 – 8%. В составе нефти выделяют углеводородную, асфальтосмолистую и зольную составные части, а также порфирины и серу. Углеводородный состав в основном представлен парафиновыми (30-35%) и нафтеновыми углеводородами (25-75%), и в меньшей степени соединениями ароматического ряда (10-20%).

## Абиотические механизмы деградации нефти.

Наиболее значимым физико-химическим механизмом деградации углеводородов нефти является их испарение. За первые сутки с верхнего слоя нефтяного пятна в летний период времени может испариться 15% нефти, или до 80% технического бензина, 22% керосина и только 0.3% компонентов мазута. Через 15 дней после разлива потери нефти за счет абиотической деградации могут составлять уже 36%. Разлившаяся нефть адсорбируется почвой и в основной массе локализуется в верхнем ее горизонте. Лишь небольшая часть углеводородов может диффундировать в подпочвенные слои, осадочные породы и грунтовые воды. Частично компоненты нефти на поверхности загрязненного участка подвергаются окислению и фотоокислению, однако, дальнейшее разрушение углеводородов нефти связано с процессами их биохимического окисления, которое происходит при участии нефтеокисляющих микроорганизмов.

# Методы очистки окружающей среды от нефти и нефтепродуктов.

Известные методы рекультивации загрязненных нефтью территорий условно можно подразделить на несколько групп:

- • Механические методы;
- • Термические методы;
- • Физико-химические методы;
- • Микробиологические методы.

# Механические методы.

## А) Локализация и сбор нефти.

- всасывание плавающими насосами
- гидрофобный транспортер
- вихревой способ
- гидрофобные скиммеры

## Б) Системы сдерживания, барьеры.

## В) Механическое разделение и отжим.

## Г) Вывоз и захоронение.

## Д) Изолирование загрязнения.

## Е) Землевание.

## Ж) Использование полимерного покрытия.



# Термические методы

- А) Выжигание нефти и нефтепродуктов in situ.
- Б) Сжигание нефти и нефтепродуктов ex situ.
- В) Термическая десорбция ex situ.
- Г) Термоэкстракция.
- Д) Метод ленточных микровзрывов.

# Физико-химические методы

- А) Промывка почвы.
- Б) Экстракция нефтепродуктов в вакуумных камерах.
- В) Стабилизация/затвердевание нефти.
- Г) Экстракция растворителем.
- Д) Использование электроосмотического эффекта.
- Е) Флотационный метод.
- Ж) Применение сорбентов.
- З) Химическое окисление.

# Биоремедиация территорий, загрязненных нефтью.

**Биоремедиация** (от *био* и лат. *remedio* – лечение, восстановление), использование живых организмов – бактерий, дрожжей, грибов, водорослей и растений – для детоксикации загрязняющих веществ (поллютантов) или снижения их концентрации в окружающей среде. Ведущую роль в процессах биоремедиации играют сообщества микроорганизмов, эффективно разлагающие поллютанты или превращающие их в менее токсичные соединения.

Существует **два основных подхода к биоремедиации**. Первый заключается в экскавации (удалении) загрязненного материала с последующей его детоксикацией (в биореакторах, путем компостирования). Это биоремедиация *ex situ*. Второй подход (биоремедиация *in situ*) состоит в детоксикации загрязнителя либо путем активации природных микроорганизмов (внесение дополнительных питательных веществ, улучшение аэрации, поддержание оптимального уровня влажности), либо путем внесения специализированных биопрепаратов.

# Биодеградация органических соединений.

Под **биодеградацией** понимают процесс полного или частичного разрушения органических соединений микроорганизмами с использованием продуктов разложения в качестве источников углерода и энергии.

Бактерии родов *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Shingomonas*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Metanobacterium*, *Mycobacterium*, *Brevibacterium*, актиномицеты (*Streptomyces*, *Endomyces*, *Nocardia*), грибы (*Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Penicillium*), дрожжи (*Candida*, *Rhodotorula*, *Torula*, *Trichoderma*, *Hansenula*, *Saccharomyces*).

# Принципы микробиологической деструкции нефти.

В большинстве случаев, метаболизм **парафиновых углеводородов** начинается с терминального окисления концевой метильной группы в спирт и, далее, через альдегид до соответствующей жирной кислоты. Дальнейшее окисление углеводорода протекает по пути, который известен как **бета-окисление жирных кислот**, при котором за каждый цикл длина цепочки жирной кислоты укорачивается на два углеродных атома. **Изоалканы** окисляются слабее **n-алканов**, так как терминальные метильные разветвления ограничивают или полностью блокируют биodeградацию. **Низкомолекулярные циклоалканы** нафтенной фракции нефти, хотя и не так часто, могут служить субстратом микроорганизмов. **Средне- и мало конденсированные нафтены** разлагаются значительно медленнее, а высоко конденсированные циклоалканы сравнительно устойчивы к микробной атаке. Метаболические превращения **моноклических ароматических углеводородов**, как правило, включают реакции гидроксирования, и, только после этого, ароматическое кольцо расщепляется по орто- или мета- пути. **Основными продуктами биodeградации углеводородов нефти** являются углекислый газ, вода и биомасса микроорганизмов, выросших на углеводородах. При этом, как бы сложно не были организованы низкомолекулярные компоненты нефти, они достаточно активно подвергаются метаболическому расщеплению.

# Методы интенсификации микробиологической деградации нефти и нефтепродуктов.

два принципиальных подхода:

- Стимулирование активности аборигенной углеводородокисляющей микрофлоры.
  - Интродукция активных штаммов углеводородокисляющих организмов, а также их ассоциаций путем интродукции их в загрязненные объекты в виде биопрепарата.
- **Аэрация почв.**
  - **Полив.**
  - **Оптимизация температурного режима.**
  - **Внесение минеральных удобрений.**
  - **Внесение органических удобрений.**
  - **Известкование.**
  - **Внесение биостимуляторов.**
  - **Диспергирование нефти с помощью поверхностно активных веществ.**
  - **Фитомелиорация.**

# Биоремедиация водных систем, загрязненных нефтью.

Среди водных сред потенциально подвергающихся загрязнению нефтью можно выделить следующие:

1. • поверхностные воды, в том числе Мировой океан (акватория морей и океанов) и пресные воды (реки, озёра и т.д.);
2. • грунтовые воды;
3. • сточные воды.

# Разработка биопрепаратов.

- **Скрининг и исследование углеводородокисляющих микроорганизмов**
- **Подбор ассоциаций микроорганизмов – деструкторов нефти.**
- **Интродукция углеводородокисляющих микроорганизмов.**

## Growth of strains on different substrates

	Diesel fuel	Crude oil	Mazut	Naphthalene	Toluene	Hexadecane	LB 5% NaCl
Rhodococcus sp. S25	+	+	+	-	+	+	+/-
Rhodococcus sp. S26	+	+	+	-	+	+	+/-
Rhodococcus sp. S67	+	+	-	-	+	+	-
Rhodococcus sp. X5	+	+	-	-	-	+	-
Rhodococcus sp. X25	+	+	-	-	-	+	-
Pseudomonas sp. 142NF(pNF142)	+	+	-	+	-	+	+
P. putida ars 6F	+/-	++		+	-	-	+
Microbacterium sp. ars 25	++	++		+	-	+	+
Rhodococcus equi ars 38	+	+		-	+	+	+

## Emulsifying activity of degrader strains at 24°C

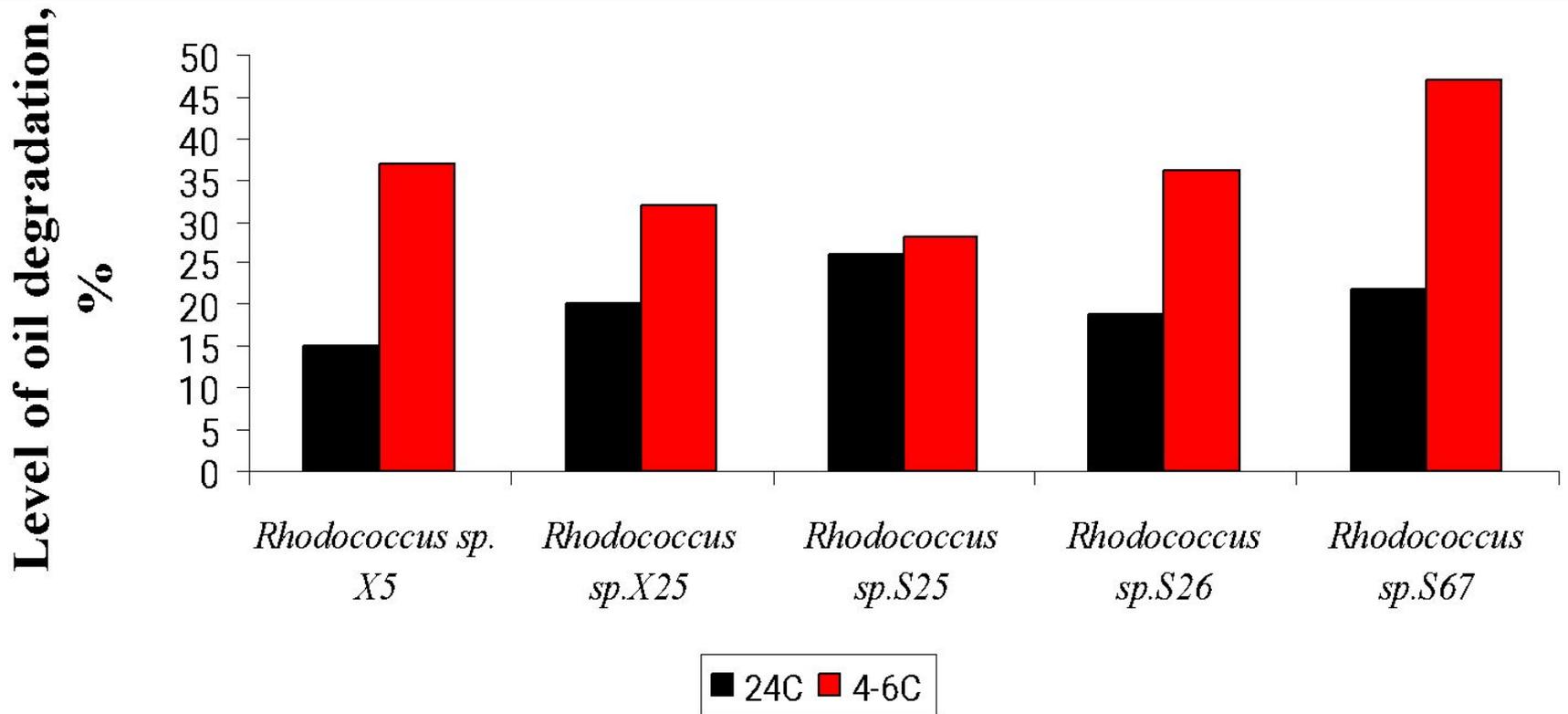
Degrader strain	Visual		By OD	
	Without NaCl	3% NaCl	Without NaCl	3% NaCl
<i>Rhodococcus</i> sp. X5	4	4	1,329	0,103
<i>Rhodococcus</i> sp. X25	4	4	0,120	0,098
<i>Rhodococcus</i> sp. S25	4	4	0,061	0,036
<i>Rhodococcus</i> sp. S26	4	2	0,085	0,031
<i>Rhodococcus</i> sp. S67	3	3	0,551	0,121
<i>Pseudomonas</i> sp. 142NF(pNF142)	4	2	0,114	0,044
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> 1393(pNF::TnModOTc)	1-2	2	0,049	0,052
<i>Pseudomonas putida</i> KT2442(pNF::TnModOTc)	4	3	0,053	0,118
<i>Pseudomonas putida</i> Sh1(4)	3	3	0,031	0,04
<i>Rhodococcus erythropolis</i> Sh5	4	3	0,170	0,04
<i>Microbacterium liquefaciens</i> Ash10(2)	2	2	0,057	0,05

*Rhodococcus* strains are of endo-type of biosurfactants production  
*Pseudomonas* strains are of exo-type of biosurfactants production

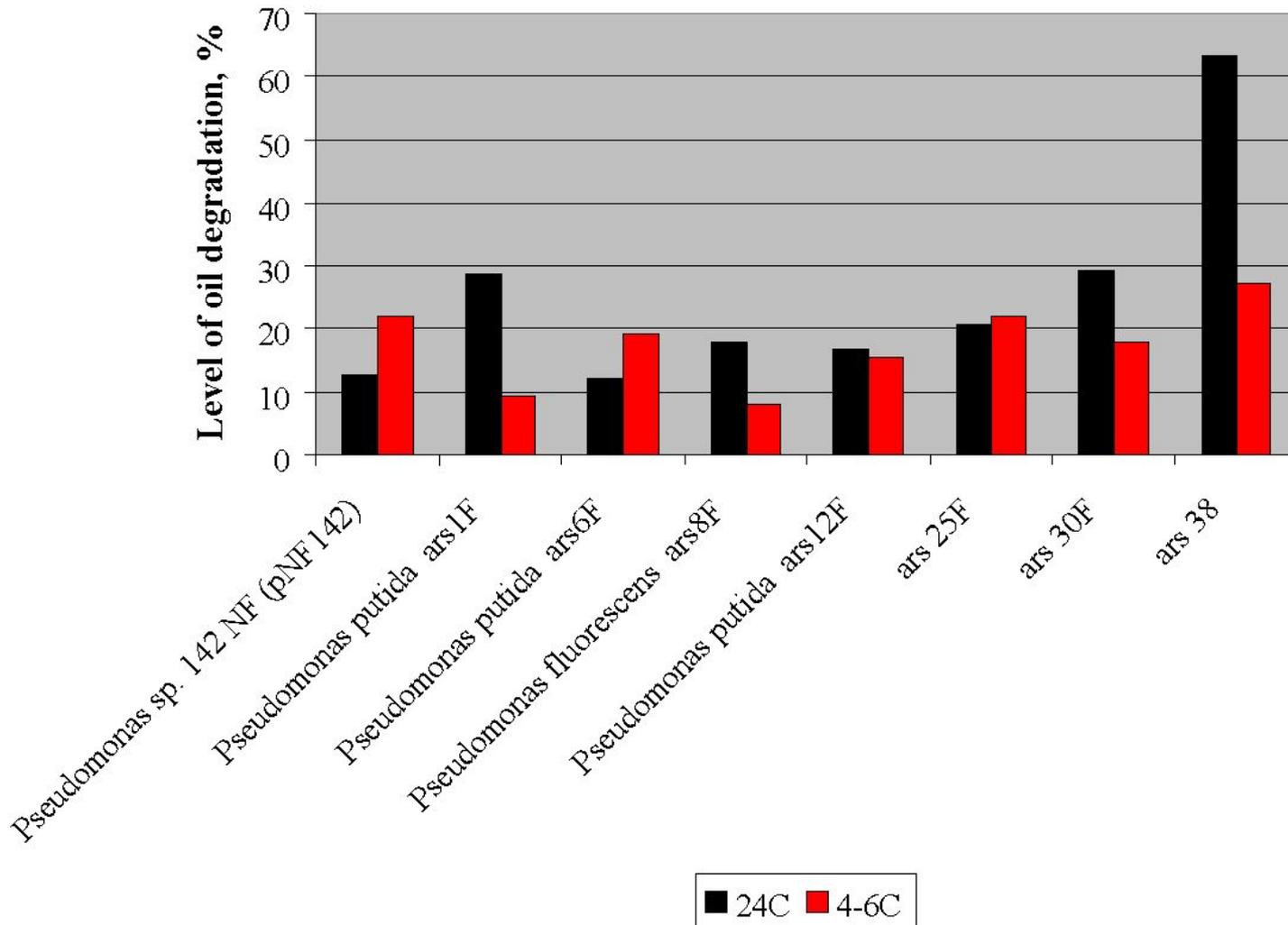
# Change of crude oil fraction composition after 7 days incubation at 24°C and 4-6°C

Degrader strains	Level of degradation, %		Decrease of oil fractions, %					
			Hexane fraction, %		Benzene fraction, %		Benzene-alcohol fraction, %	
	24°C	4-6°C	24°C	4-6°C	24°C	4-6°C	24°C	4-6°C
<i>Rhodococcus</i> sp. X5	15	37	28	33	30	31	13	38
<i>Rhodococcus</i> sp. X25	20	32	36	25	13	28	13	25
<i>Rhodococcus</i> sp. S25	26	28	37	22	15	26	24	38
<i>Rhodococcus</i> sp. S26	19	36	34	33	6	38	6	38
<i>Rhodococcus</i> sp. S67	22	47	31	43	5	38	12	50
<i>Pseudomonas</i> sp. 142NF(pNF142)	22	37	21	30	23	33	19	38
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> 1393(pNF::TnModOTc)	24	ND	24	ND	19	ND	18	ND

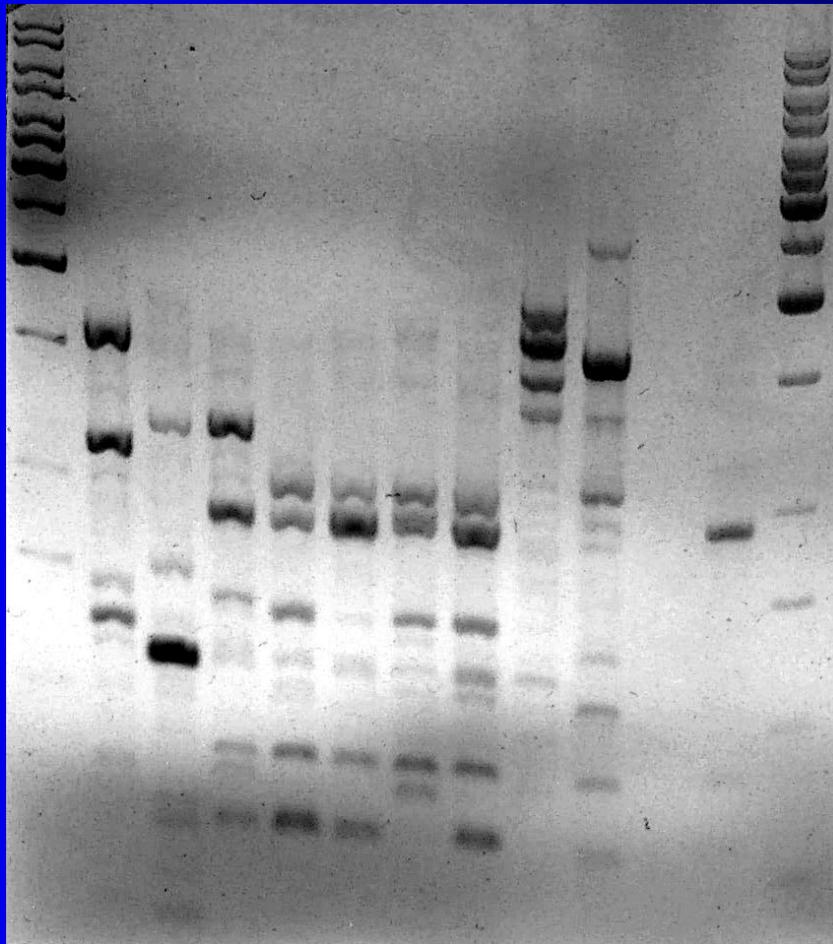
## Degradation of crude oil by *Rhodococcus* strains at 24°C and 4-6°C during 7 days



# Degradation of crude oil by *Pseudomonas* and unidentified strains at 24°C and 4-6°C during 7 days



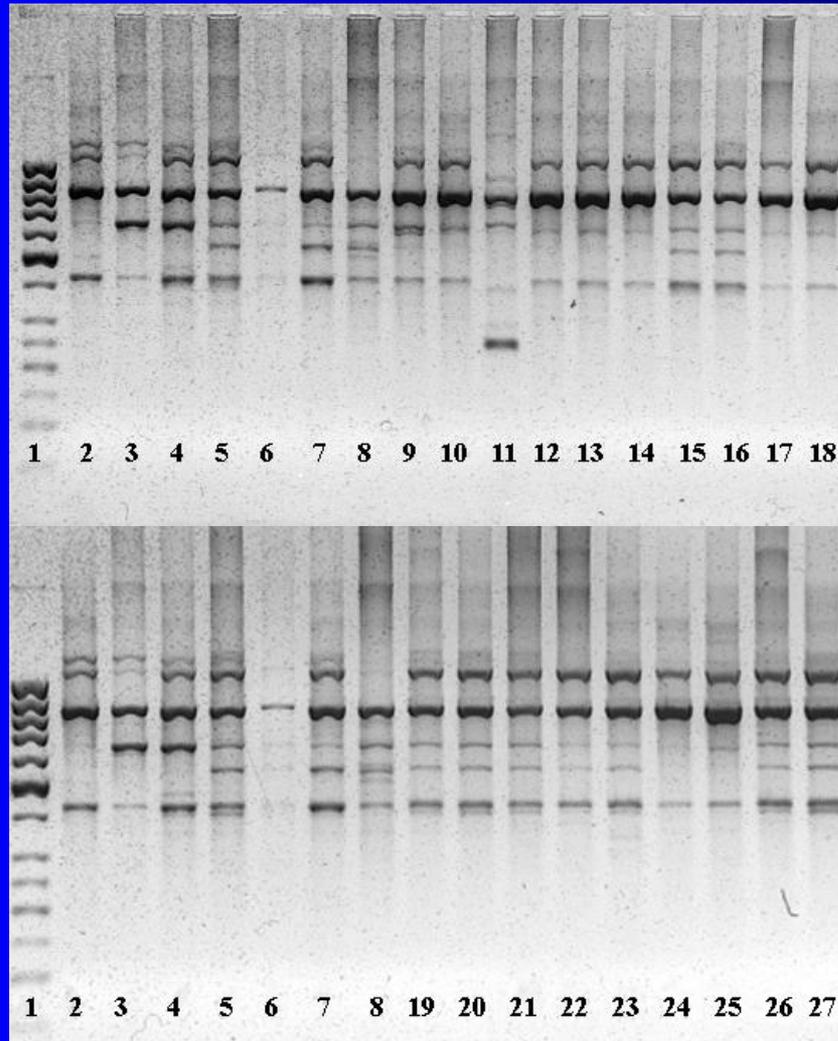
## REP-PCR pattern with Box A1R primer



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

- 1, 12 – 1 kb DNA Ladder
- 2 – Gram negative S41
- 3 – *Pseudomonas* sp.  
142NF(pNF142)
- 4 – *Rhodococcus* sp. X25
- 5 – *Rhodococcus* sp. S67
- 6 – *Rhodococcus* sp. S25
- 7 – *Rhodococcus* sp. Sh5
- 8 – *Rhodococcus* sp. S26
- 9 – *Pseudomonas aureofaciens*  
1393(pNF::TnMod-OTc)
- 10 – *Pseudomonas putida*  
KT2442(pNF::TnMod-OTc)
- 11 – *Rhodococcus* sp. X5

# RAPD analysis of *Rhodococcus* strains ( with OA20 primer)



1- 50 pb Ladder (Fermentas)

2- *Rhodococcus* sp. S25

3- *Rhodococcus* sp. S26

4- *Rhodococcus* sp. S67

5- *Rhodococcus* sp. X5

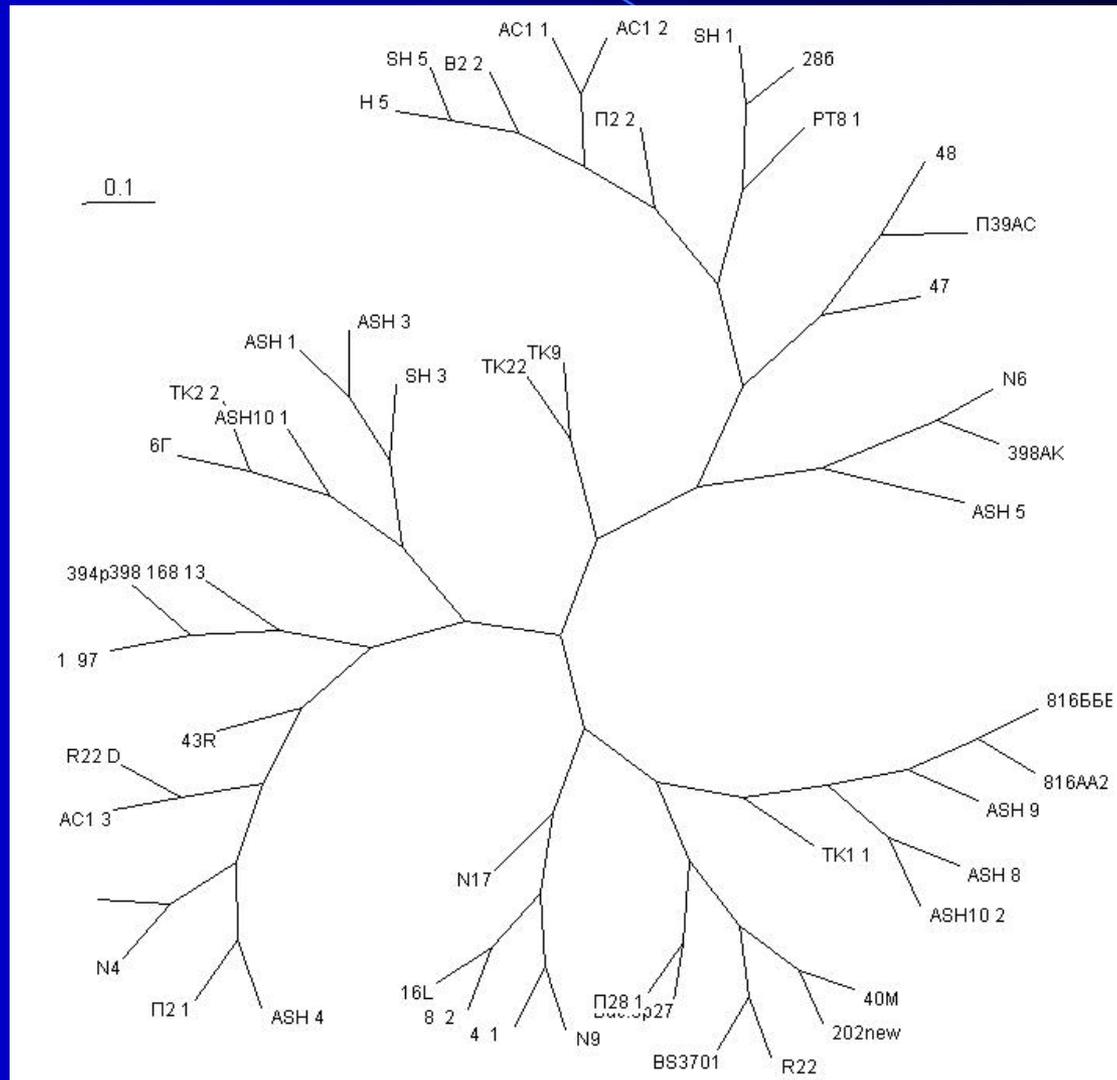
6- *Rhodococcus* sp. X25

7- *Microbacterium* sp. ars25

8- *Rhodococcus equi* ars38

9-27- predominating clones after  
the cultivation in liquid mineral  
medium

# Dendrogram of Oil-degrading Strains Based on Their Catabolic and Physiological Properties



**Empirical association:**

*Rhodococcus* sp. X5,

*Rhodococcus* sp. S67,

*Pseudomonas* sp. 142NF(pNF142) and

*Rhodococcus* sp. S25

**Selected association:**

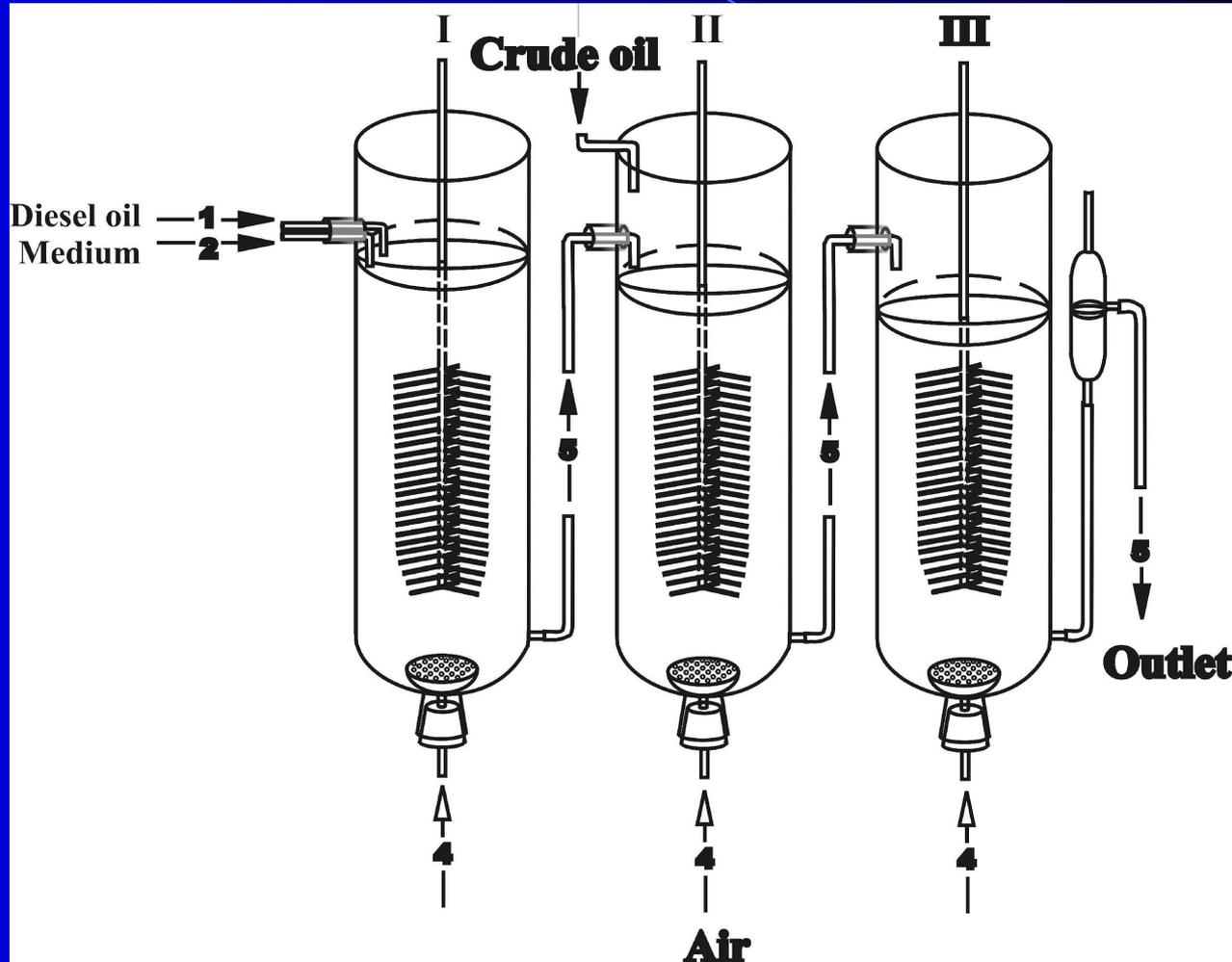
*Rhodococcus* sp. X5,

*Rhodococcus* sp. S67,

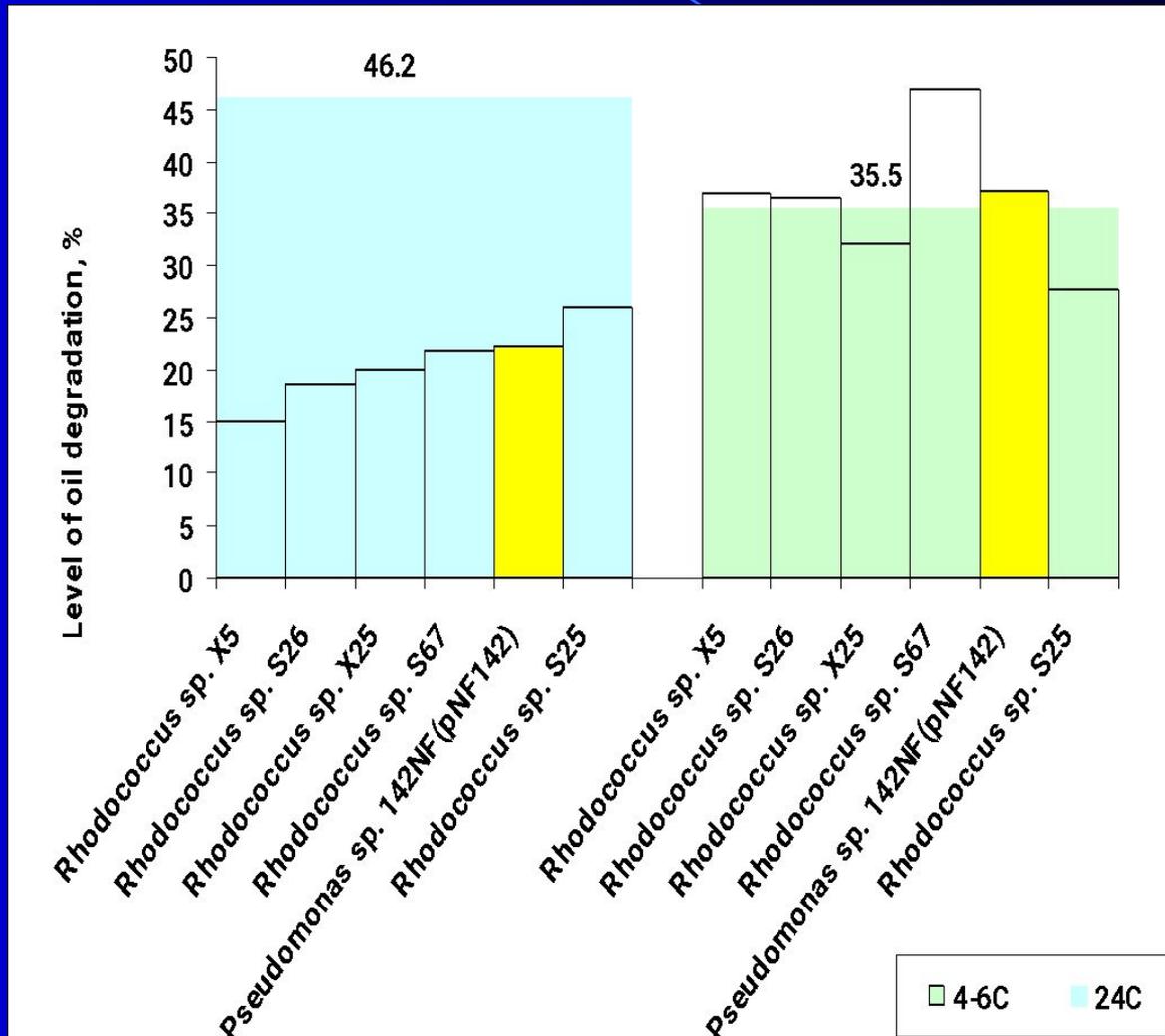
*Pseudomonas* sp. 142NF(pNF142) and

*Pseudomonas putida* BS3701(pBS1141, pBS1142).

# Model Flow System for selection of active degrader strains



# Degradation of crude oil by individual strains and association at 24°C and 4-6°C during 7 days



# Oil degradation in flasks by microorganisms incubated on orbital shaker at 6°C



- 1 – control without microorganisms
- 2 – *Pseudomonas* strains
- 3 – *Rhodococcus* strains
- 4 – both the strains

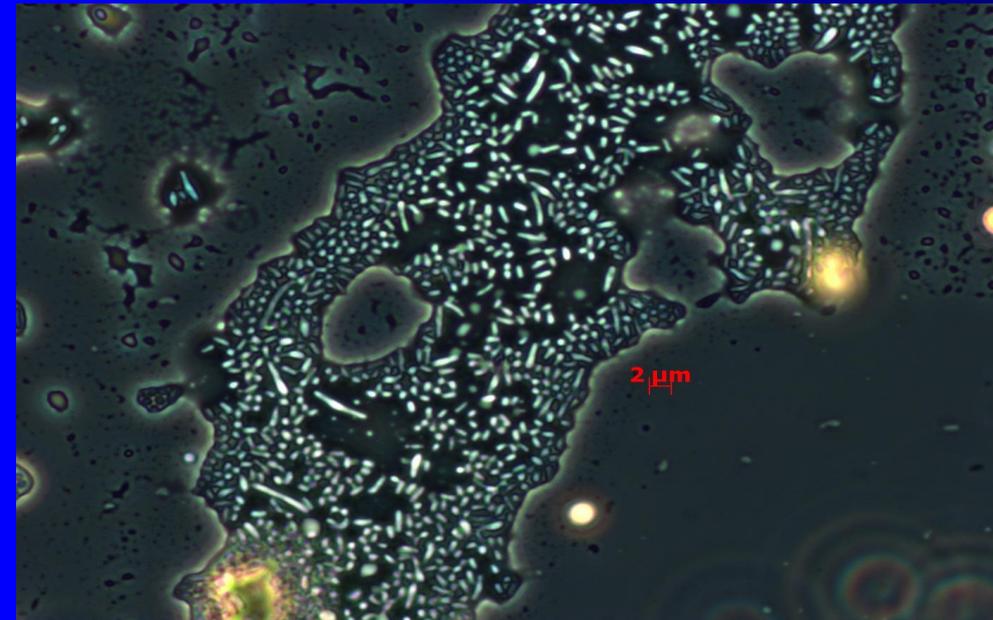
1

2

3

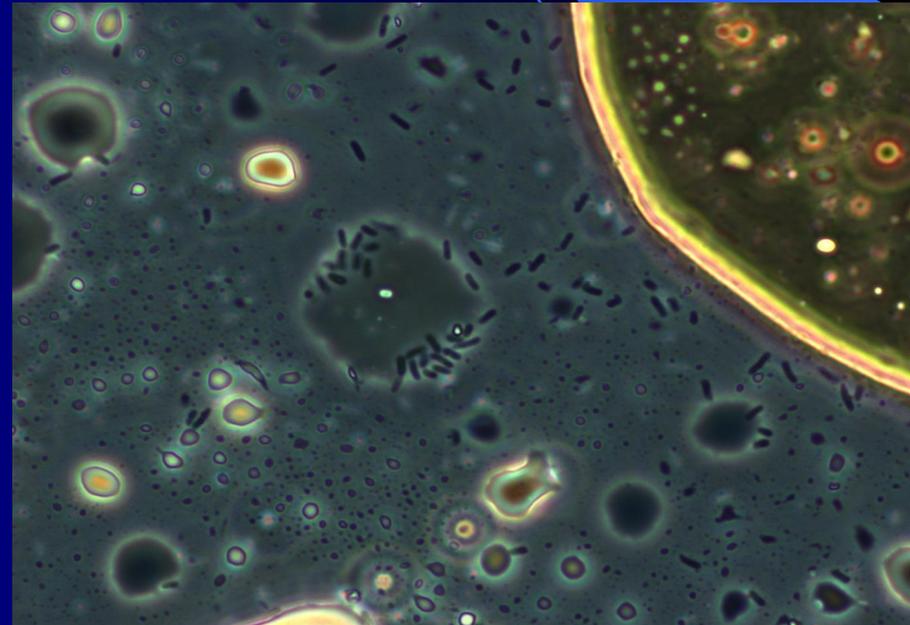
4

# Фото микроорганизмов в среде с нефтью



*Rhodococcus* на нефти

*Pseudomonas* на нефти



# Микроорганизмы в среде с гексадеканом



*Pseudomonas*

*Rhodococcus*



# Examples of plasmids encoding the degradation of predominantly naturally occurring organic compounds

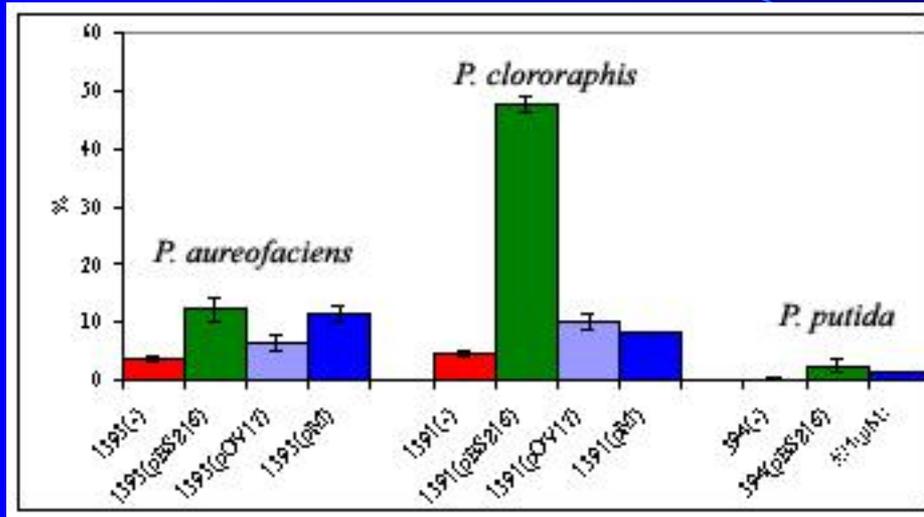
(data from E.M. Top *et al.*, 2000)

<i>Strain</i>	<i>Plasmid</i>	<i>Substrates</i>	<i>Size (kb)</i>	<i>Inc-group</i>
<b>Aliphatic compounds:</b>				
<i>Pseudomonas oleovorans</i> PpG6	OCT	Octane, decane	500	P2
<i>Pseudomonas putida</i> PPU2	pSRQ	Acyclic isoprenoid (citronellol, geraniol)	75	-
<b>Monoaromatic compounds:</b>				
<i>P.putida</i> R1	SAL1	Salicylate	85	P9
<i>P.putida</i> PpG1	CAM	Camphor	500	P2
<i>P.putida</i> PaW1	TOL	Xylene, Toluene	115	P9
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RJE74	pWW174	Benzene	200	-
<i>Pseudomonas sp.</i> CIT1	pCIT1	Aniline	100	-
<i>P.putida</i> ST	pEG	Styrene	37	-
<i>P.putida</i> RE204	pRE4	Isopropyl benzene	105	-
<i>P.putida</i> NCIB9869	pRA500	3,5-xylenol	500	-
<i>Pseudomonas sp.</i> CF600	pVI150	Phenol	-	P2
<i>P.putida</i> CINNP	pCINNP	Cinnamic acid	75	-
<b>Polyaromatic compounds:</b>				
<i>P.putida</i> PpG7	NAH7	Naphthalene, Phenanthrene, Anthracene	83	P9
<i>Pseudomonas sp.</i> CB406	pWW100	Biphenyl	200	-
<b>Heterocyclic compounds:</b>				
<i>Pseudomonas convexa</i> Pcl	NIC	Nicotine, Nicotinate	-	-
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> DBT2	pDBT2	Dibenzothiophene	80	-

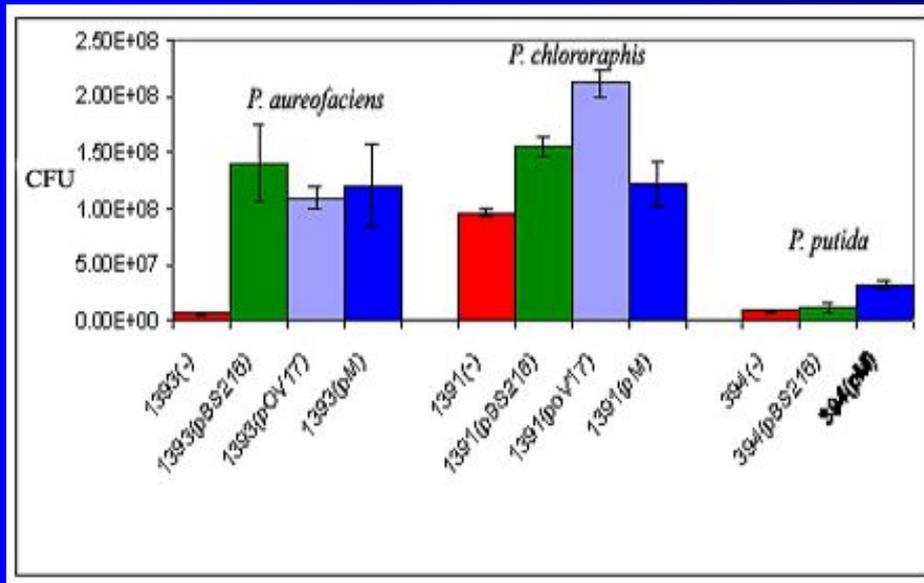
# Methods of Improvement of Degradative Microorganisms

- Mutagenesis and selection
- Genetic engineering *in vitro*
- Protein engineering
- “Molecular breeding”
- Use of plasmids for genetic manipulation *in vitro*

# Plasmid-enhanced biodegradation of crude oil

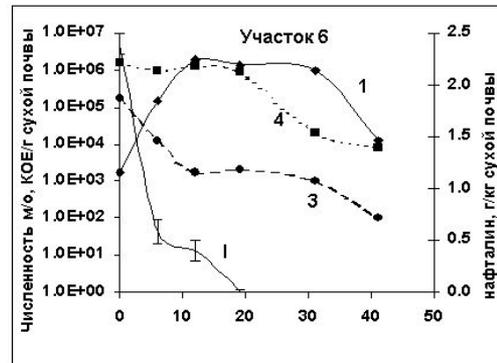
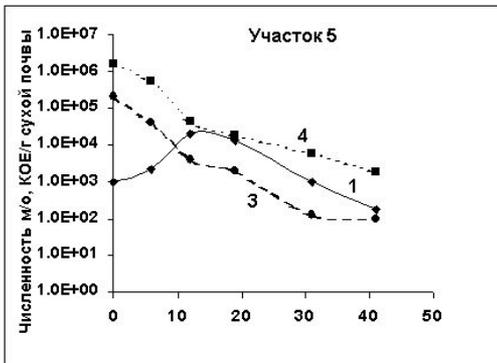
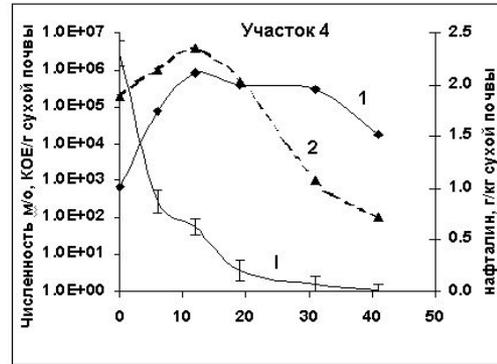
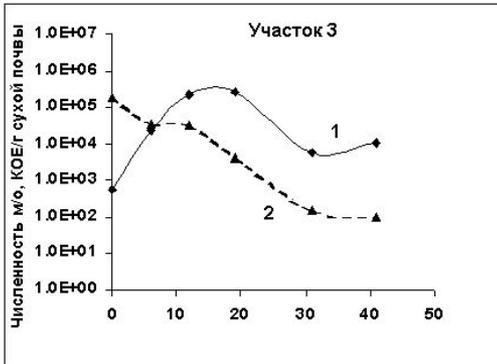
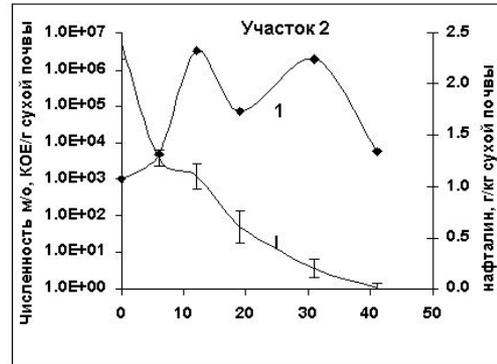
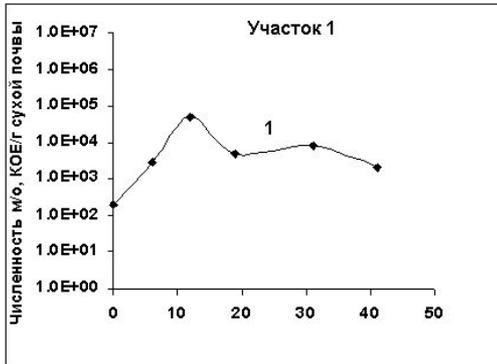


Oil degradation by plasmid-bearing and free-plasmid strains after 7 days of incubation



CFUmax of plasmid-bearing and free-plasmid strains after 7 days of incubation in crude oil

# Horizontal transfer of catabolic plasmids accelerates naphthalene biodegradation in open and model soil

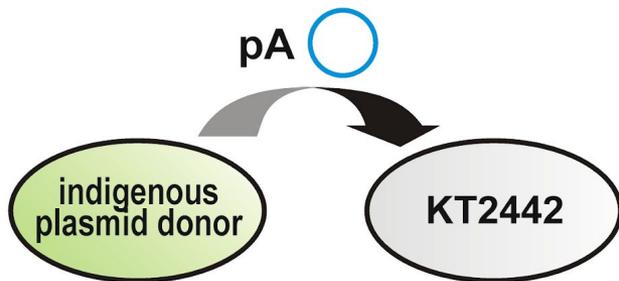


Динамика численности микроорганизмов и содержания нафталина в почве  
 1 – численность аборигенных деструкторов нафталина  
 2 – численность плазмидосодержащего штамма *P. putida* KT2442(pNF142::TnMod-OTc)  
 3 – численность бесплазмидного штамма *P. putida* KT2442  
 4 – численность штамма *P. putida* BS394(pNF142::TnMod-OTc)  
 I – кривая убыли нафталина

# HORIZONTAL TRANSFER OF NAPHTHALENE BIODEGRADATIVE PLASMIDS IN THE SOIL

## LABORATORY EXPERIMENT

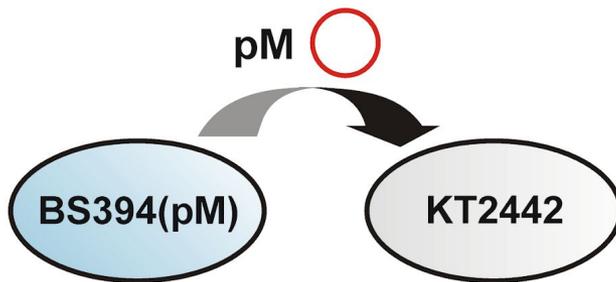
NON-STERILE CONDITIONS



Acceleration of naphthalene degradation

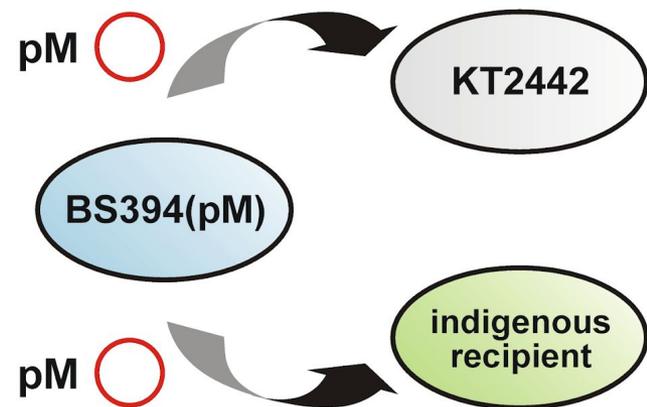
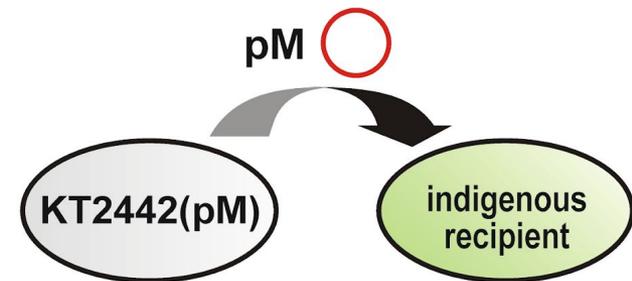


NON-STERILE AND STERILE CONDITIONS



pA - indigenous naphthalene biodegradative plasmid  
pM - labeled naphthalene biodegradative plasmid

## FIELD EXPERIMENT

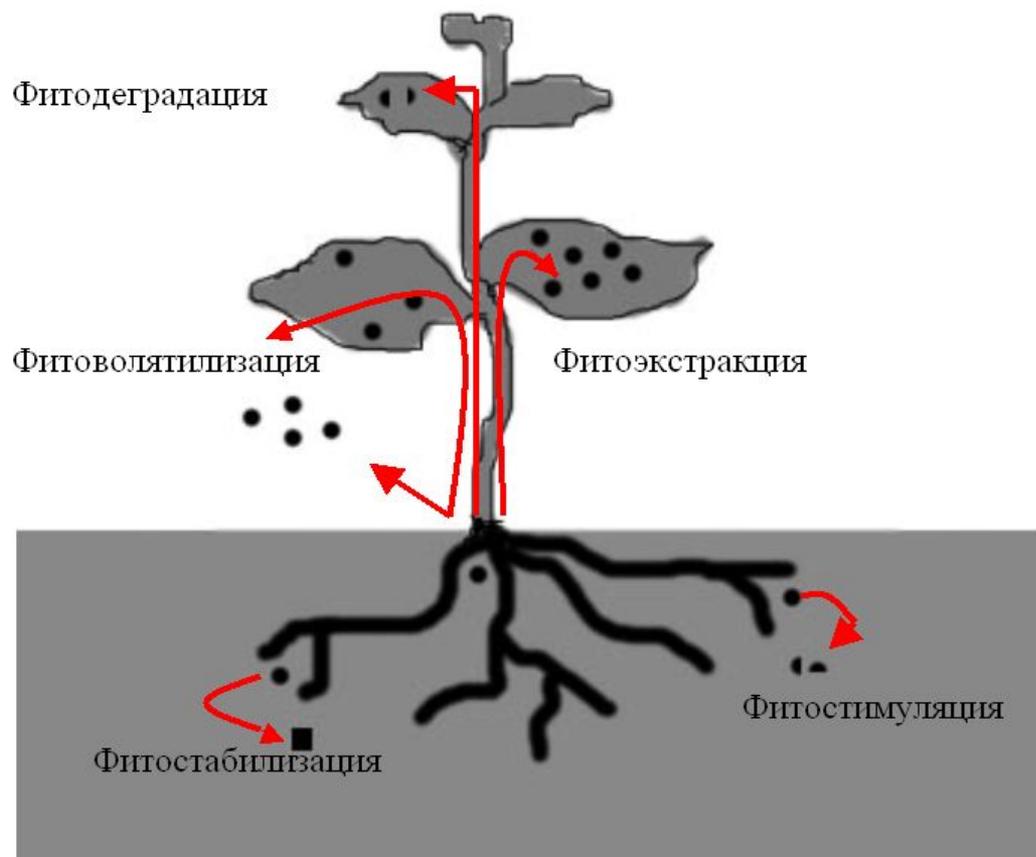


# Фиторемедиация.

В фиторемедиации принято выделять несколько направлений:

- Фитоэкстракция – использование растений, аккумулирующих органические и неорганические загрязнители в наземной части с целью удаления их из почвы.
- Фитодеградация (ризоремедиация) – использование растений и ассоциированных с ними микроорганизмов для деградации органических загрязнителей.
- Ризофильтрация – использование корней растений для адсорбции и абсорбции загрязнителей, главным образом металлов, из воды и сточных вод.
- Фитоиспарение - использование растений для удаления загрязнителей в газообразном виде.
- Использование растений для удаления загрязнителей из воздуха.
- Фитостабилизация - некоторые виды растений могут успешно произрастать на наиболее загрязненных грунтах, образуя плотную дернину, которая может содействовать стабилизации почвы, препятствуя таким образом выходу пыли и миграции загрязненных вод.

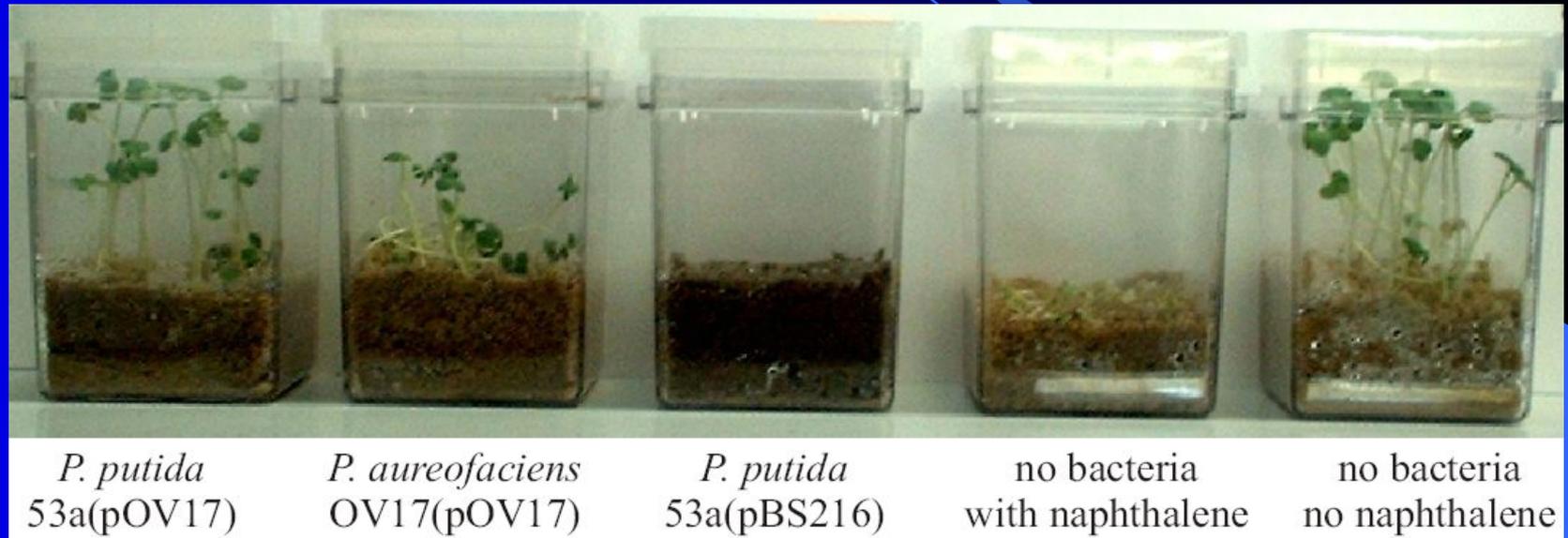
# Схема механізмів фіторемедиації



# Naphthalene toxic effect on the sprouts of white mustard (*Sinapis alba*.L)



# Effect of naphthalene degradative plasmids on interaction of PGPR strains and mustard plants (*Brassica juncea* L.) under gnotobiotic conditions in sand supplemented with naphthalene.



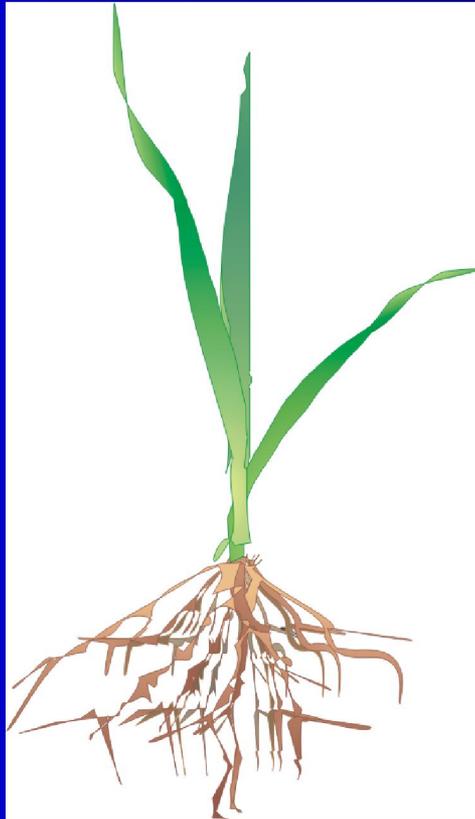
Treatment of seedlings with plasmid-bearing rhizobacteria led to a pronounced protective effect from naphthalene.

The exception was the seedlings treated with *P. putida* 53a(pBS216). In this case no seed germination was observed

Plant



Rhizosphere  
bacteria  
*Pseudomonas*



PHYTOREMEDIATION



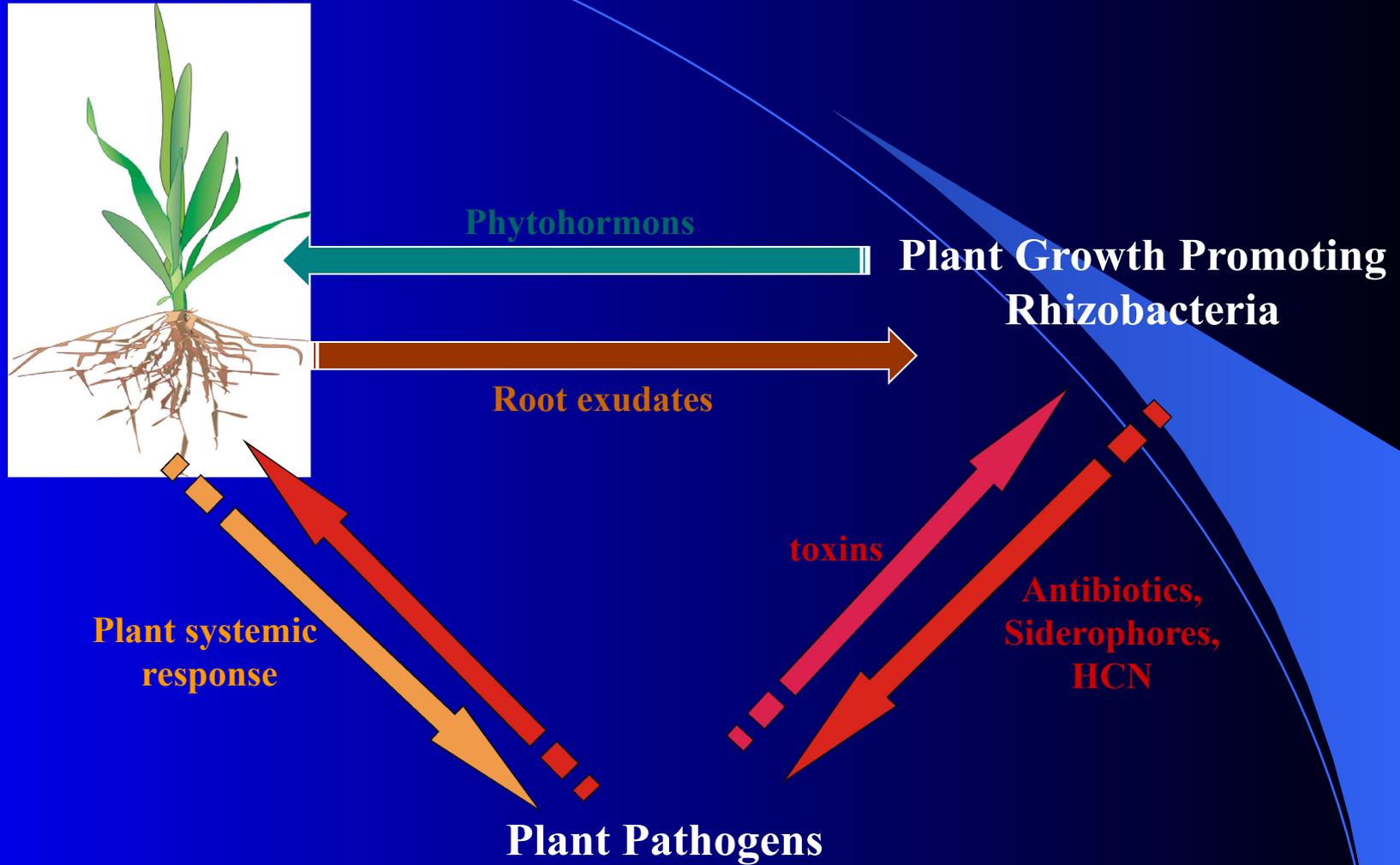
ACCUMULATION  
OF POLLUTANTS

BIOREMEDIATION



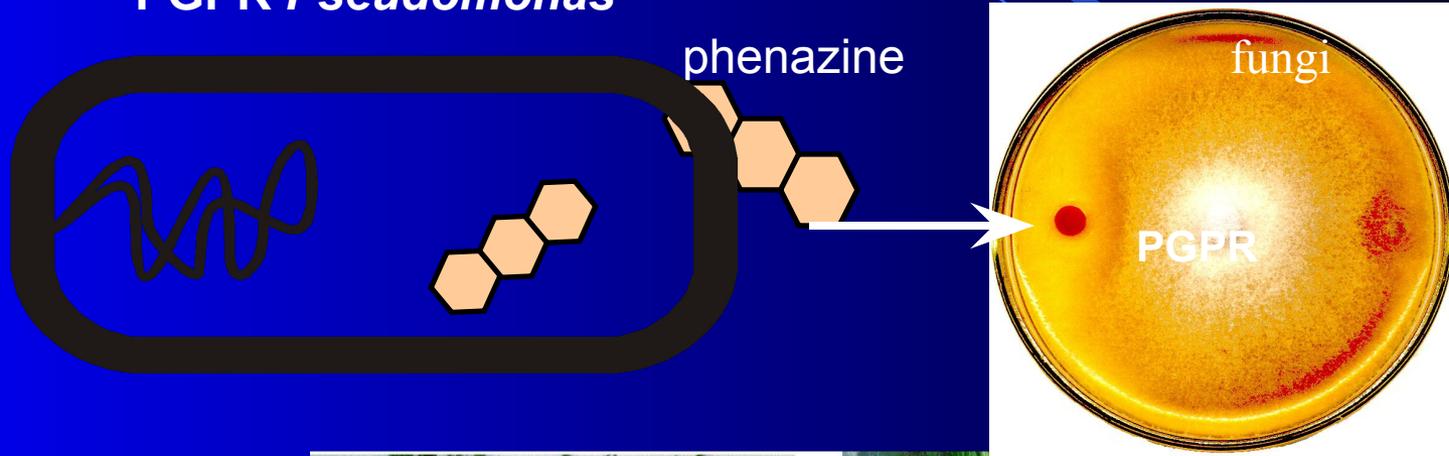
DEGRADATION  
OF TOXIC  
ORGANIC  
COMPOUNDS

# Plant-Microbial Interaction in Rhizosphere



PGPR *Pseudomonas* colonize the plant root, suppress the phytopathogenic fungi and stimulate the plant growth

PGPR *Pseudomonas*



-- PGPR *Pseudomonas* +



# Pushchino

