

ДЭЛЕГАН ЯНИНА АДАЛЬБЕРТАЎНА

**АСАЦЫЯЦЫЯ ТЭРМАТАЛЕРАНТНЫХ
БАКТЭРЫЙ-ДЭСТРУКТАРАЎ НАФТЫ ДЛЯ
РЭМЕДЫЯЦЫИ ЗАБРУДЖАНЫХ НАФТАЙ
ГРУНТОЎ І ВОДАЎ ВА ЁМОВАХ ГАРАЧАГА
КЛІМАТУ**

*Пушчынскі дзяржаўны прыродазнаўчанавуковы інстытут
Інстытут біяхіміі і фізіялогіі мікраарганізмаў імя Г.К. Скрабіна РАН
м. Пушчына, Маскоўская вобл., Расія*

+7(961)261-99-71

+(37529)994-94-57

mewgia@ya.ru

Кошты апрацоўкі гектара забруджанага нафтай грунту рознымі метадамі

Метад	Кошты апрацоўкі, \$	Адметныя рысы	Спасылкі
LTTD – нізкатэмпэратурная тэрмальна дэсорбцыя	>125 тыс.	Выпарванне рэчываў праз награванне да 50°C. Недахопы: выдаткі на перавозку глебы ў выпадку <i>ex situ</i> , вільготную глебу папярэдне трэба дадаткова сушыць	http://www.epa.gov/oust/cat/ltttd.htm
HTTD – высокатэмпэратурная тэрмальна дэсорбцыя	>315 тыс.	Награванне забруджанай глебы да 320-560°C. Недахопы: разбуральны ўплыў на глебу	http://www.rlctechologies.com/sg_userfiles/Completed Projects and Case Studies.pdf
барбатаванне паветрам	>10 тыс.	Упырскванне паветранага струменя ў глебу. Гэта дазваляе перавесці забруджвальнік ў газавую фазу. Недахопы: можа справакаваць міграцыю забруджвальнікаў, у слаістых глебах неэфектыўна	http://www.epa.gov/oust/cat/airsparg.htm
біякампастанне	>35 тыс.	Выкарыстанне абарыгенных мікраарганізмаў забруджанай глебы	http://www.epa.gov/oust/cat/biopiles.htm
біяпрэпараты	>9 тыс.	Унясенне монакультураў альбо кансорцыюмаў бактэрый-нафтадэструктараў з мэтай ачысткі грунту	патэнт РФ №2365438 патэнт РФ № 2337069

* Пры глыбіні пласта грунту 30 см і сярэдняй шчыльнасці грунту 1500 кг/м³ маса гектара грунту складае 4500 тон

Біяпрэпараты з верхняй мяжой тэмпературнага дыяпазону 40-45°C

Прэпарат	Мікраарганізмы, дадаткі	Умовы выкарыстання	Таварны выгляд
патент РФ №2365438, Карасева Э.В. с соавт., КубГУ, 2006	<i>Arthrobacter</i> sp. ВКМ Ас-2272 Д і <i>Rhodococcus</i> sp. ВКМ Ас-2045 Д; мас. %: гліцерын - 8-10, KNO_3 0.360-0.367, KH_2PO_4 0.054-0.055, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.126-0.128, мікраарганізмы – не менш за $3 \cdot 10^{10}$ КУА/мл, вада	Працуе пры тэмпературах да 35-40°C	культуральная вадкасць з бактэрыямі і дадаткам гліцерыну
Дестройл, ООО ПО «Сиббиофарм», заявка 2008129964/13, Надеин А.Ф.	Інфармацыі няма, верагодна, монакультура, 1×10^8 КУА/мл	рН - 4,5-8,5, тэмпературы +5-+38°C, жыццяздольны да +42°C	Ліафільна высушаны прэпарат альбо паста
Биоойл-Югра, патент РФ № 2337069, Алексеев А.Ю. с соавт., 2007	<i>Saccharomyces</i> sp. ККМ ГНЦ ВБ «Вектор» № У-1036, <i>Bacillus</i> sp. ККМ ГНЦ ВБ «Вектор» № В-1040, <i>Bacillus</i> sp. ККМ ГНЦ ВБ «Вектор» № В-1039, <i>Enterobacter</i> sp. ККМ ГНЦ ВБ «Вектор» № В-1038, не менш за 10^{12} КУА/г; сахароза, агароза, жэлатын	+1С-+41°C (оптымум 7-27 С); рН 4,5-9,0, соль да 7%	Ліафільна высушаны прэпарат
Деворойл, патент РФ №2023686, Со2F 3/34, 1994.11.30	<i>Rhodococcus</i> spp. – 3 штама, <i>Alcaligenes</i> sp., <i>Jarrowia lipolytica</i> ; солі. Пры ўнясенні ў грунт таксама дадаюць торф ці пілавінне	+5°C-+40°C, рН 5,5-9,5; соль да 15%	Ліафільна высушаны прэпарат
Олеоворин, Приказ Госкомэкологии РФ ОТ 02.04.97 №139 об утверждении ТУ на препарат «Олеоворин»	<i>Acinetobacter oleovorum</i> ; <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Micrococcus</i> sp. і <i>Xanthomonas</i> species	+3°C-+45°C, рН 3-10	Ліафільна высушаны прэпарат

МЭТА

Мэтай з'яўляецца распрацоўка кансорцыюма тэрматалерантных бактэрыяў як асновы біяпрэпарату для дэструкцыі нафты ў грунтах і водах ва ўмовах арыднага клімату з падвышанымі (да 50°C) тэмпературамі.

Мікробны прэпарат, які будзе створаны на падставе кансорцыюма, плануецца да рэалізацыі на тэрыторыях дзяржаваў СНД з мэтай рэмедыяцыі грунтоў і водаў у гарачым клімаце.

Крыніцы выдзялення тэрматалерантных штамаў

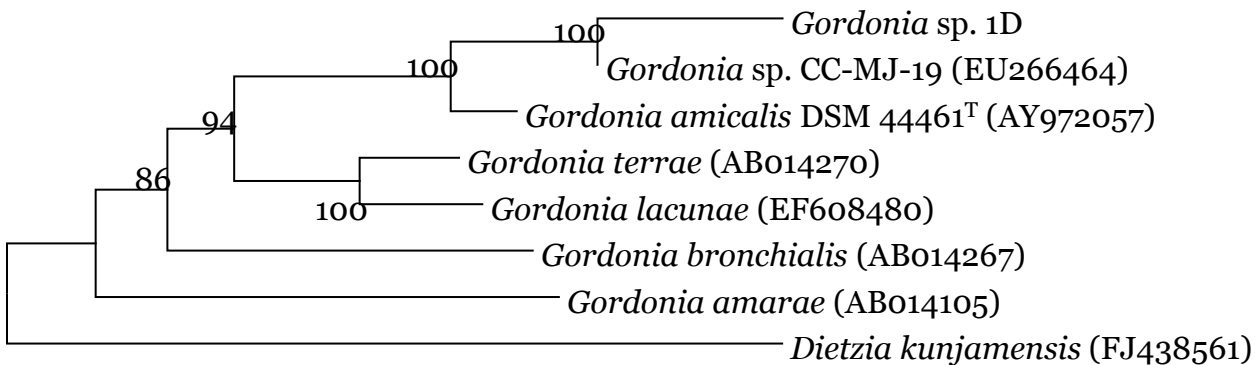
- Глеба з шламанакапляльніка, Масква
- Забруджаны нафтай грунт з тэрыторыі радовішча Паўночныя Бузачы (Казахстан)
- Забруджаны нафтай грунт з палігона (Актау, Казахстан)
- Буравы раствор (радовішча Ашчысай, Казахстан)

Метадам накапляльнага культывавання ў вадкім мінеральным асяроддзі з нафтай было выдзелена 14 тэрматалерантных штамаў, здольных да ўтылізацыі нафты пры тэмпературах да 50°C.

Таксама ў працы выкарыстоўвалі штамы, пераданыя даследчыцкім калектывам пад кіраўніцтвам праф. М.А. Ціток (БДУ, Беларусь)

- Штам AL-18 (глеба з тэрыторыі аўтобусага прыпынку, Віцебск, Беларусь)
- Штам L5A-BSU (забруджаная нафтай глеба з тэрыторыі аўтазапраўкі)

Вызначэнне таксанамічнага становішча штамаў *Gordonia*



1D – *Gordonia amicalis*
 1B – *Gordonia sp.*
 1G – *Gordonia sp.*

0.02

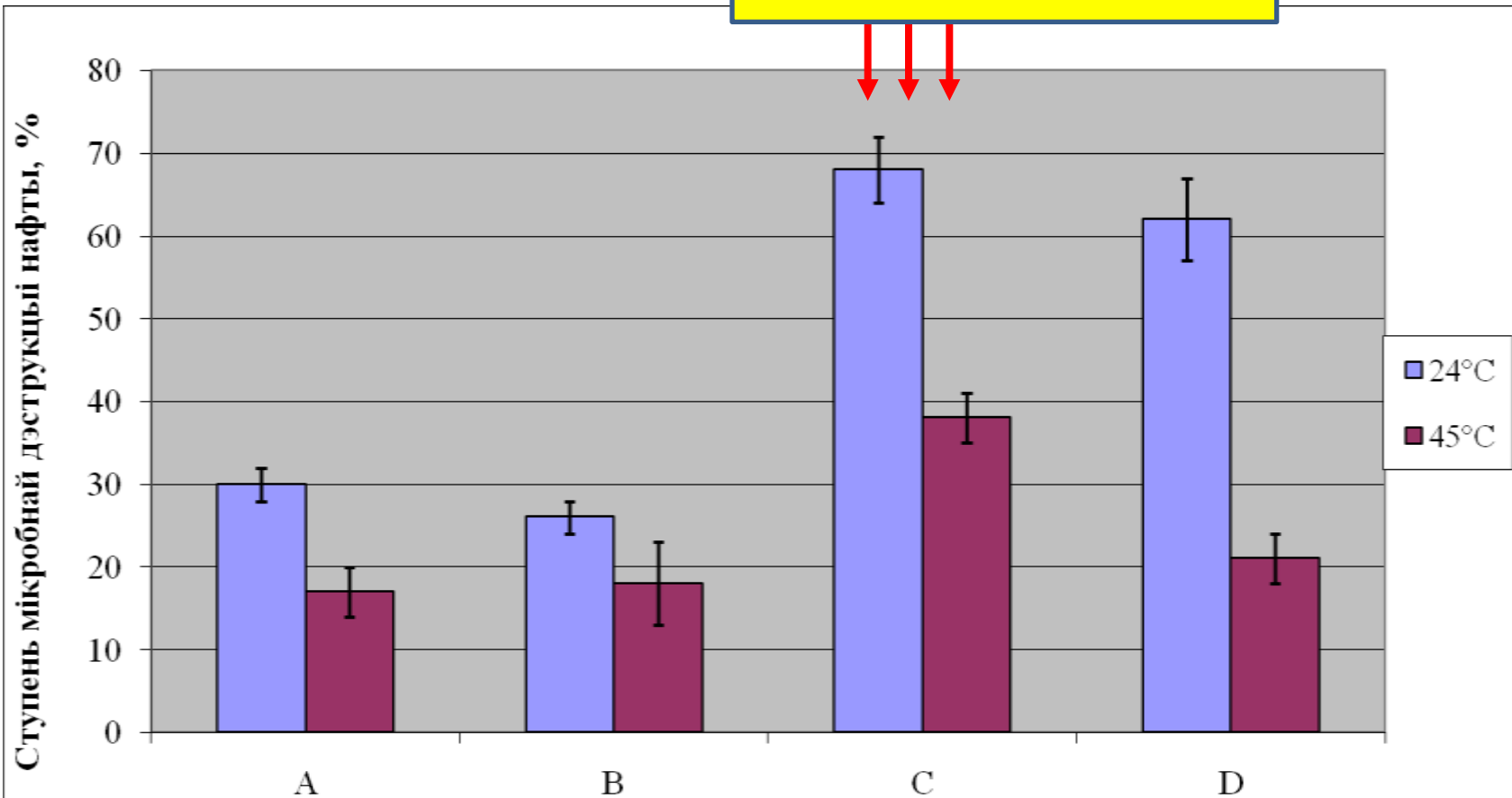
Штам	1	2	3	4	5	6	7
1 <i>Gordonia sp. 1D</i>							
2 <i>Gordonia sp. CC-MJ-19_gyrB_EU266464.1</i>	96.8						
3 <i>Gordonia amicalis_gyrB_AY972057.1</i>	96.2	95.5					
4 <i>Gordonia amarae_gyrB_AB014105.1</i>	75.8	79.9	81.0				
5 <i>Gordonia bronchialis_gyrB_AB014267.1</i>	78.8	83.3	84.1	81.6			
6 <i>Gordonia terrae_gyrB_AB014270.1</i>	84.2	88.4	88.8	81.6	86.6		
7 <i>Gordonia lacunae_gyrB_EF608480.1</i>	82.9	87.8	88.8	81.4	86.1	95.3	

МАТРЫЦА ПАДАБЕНСТВА ШТАМАЎ *RHODOCOCCUS*

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	<i>Rhodococcus</i> sp. 4D													
2	<i>Rhodococcus</i> sp. 6E	97.7												
3	<i>Rhodococcus</i> sp. 5A	98.5	98.2											
4	<i>Rhodococcus</i> sp. Par5	98.9	98.1	95.4										
5	<i>Rhodococcus</i> sp. Par6	99.0	97.9	95.3	97.2									
6	<i>Rhodococcus</i> sp. Par10	99.4	97.9	99.2	99.4	99.5								
7	<i>Rhodococcus</i> sp. Par14	97.6	99.6	95.6	94.0	94.8	97.9							
8	<i>Rhodococcus</i> sp. Par18	97.8	99.5	95.5	94.9	94.4	98.2	96.6						
9	<i>Rhodococcus</i> sp. Par2	99.1	97.7	98.7	99.6	99.5	99.3	97.9	98.1					
10	<i>Rhodococcus</i> sp. Par7	99.1	98.7	99.0	99.6	99.3	99.3	98.7	98.7	99.3				
11	<i>Rhodococcus_jialingiae</i> _KF374696	98.0	99.1	95.6	94.0	93.4	98.1	94.6	93.6	98.5	98.7			
12	<i>Rhodococcus_qingshengii</i> _KF374699	97.8	98.7	95.3	93.8	93.2	97.8	94.1	93.2	98.2	98.5	99.4		
13	<i>Rhodococcus_erythropolis</i> _AB355723	98.9	98.5	97.2	95.3	95.3	99.5	95.1	94.2	99.4	99.7	95.1	94.8	
14	<i>Rhodococcus_tukisamuensis</i> _AB262518	85.5	85.9	84.5	82.5	82.6	86.3	83.3	82.4	86.3	86.2	84.5	84.1	87.0

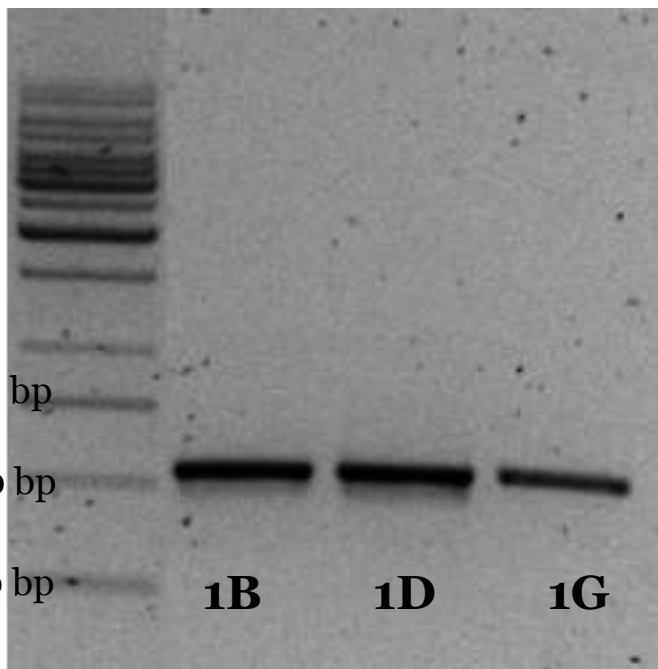
Варыянты кансорцыюмаў тэрматалерантных штамаў

Кансорцыюм А	Кансорцыюм В	Кансорцыюм С	Кансорцыюм D
<ul style="list-style-type: none"> •<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> L5A-BSU •<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> AL-18 •<i>Gordonia amicalis</i> 1D 	<ul style="list-style-type: none"> •<i>Rhodococcus</i> sp. Par6 •<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> AL-18 •<i>Gordonia amicalis</i> 1D 	<p>КАНСОРЦЫЮМ <i>Rhodococcus erythropolis</i> Par7 •<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> L5A-BSU •<i>Gordonia amicalis</i> 1D</p>	<ul style="list-style-type: none"> •<i>Rhodococcus erythropolis</i> Par10 •<i>Rhodococcus erythropolis</i> Par7 •<i>Gordonia amicalis</i> 1D

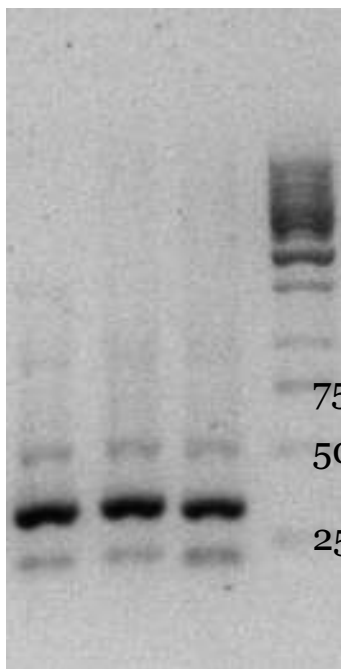


Абіятычныя страты нафты ў сістэмах склалі 6% і 11% адпаведна пры тэмпературы 24°C і 45°C

Гены біядэградацыі алканаў у *Gordonia* 1B, 1D, 1G

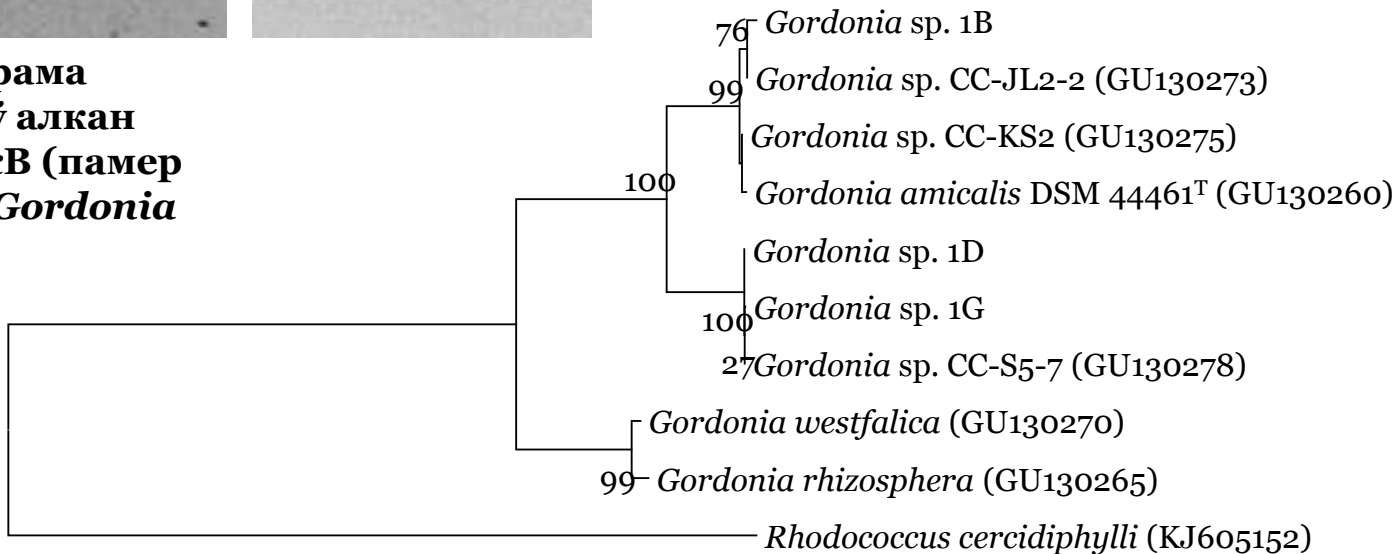


Электрафараграма ампліконаў генаў алкан манааксігеназы *alkB* (памер прадукту 550 bp) у *Gordonia*



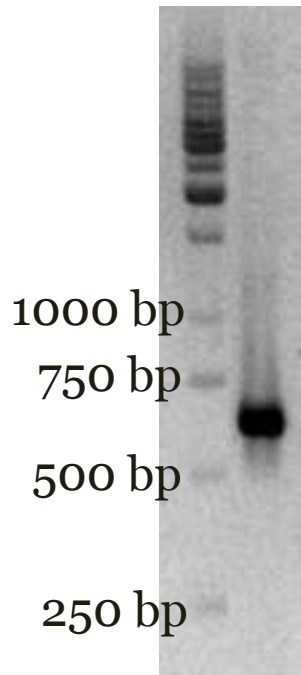
Электрафараграма ампліконаў генаў цытахромавай алкан манааксігеназы CYP153 (памер прадукту ~350 bp)

Становішча генаў *alkB* штамаў 1B, 1D і 1G сярод генаў *alkB* іншых *Gordonia*

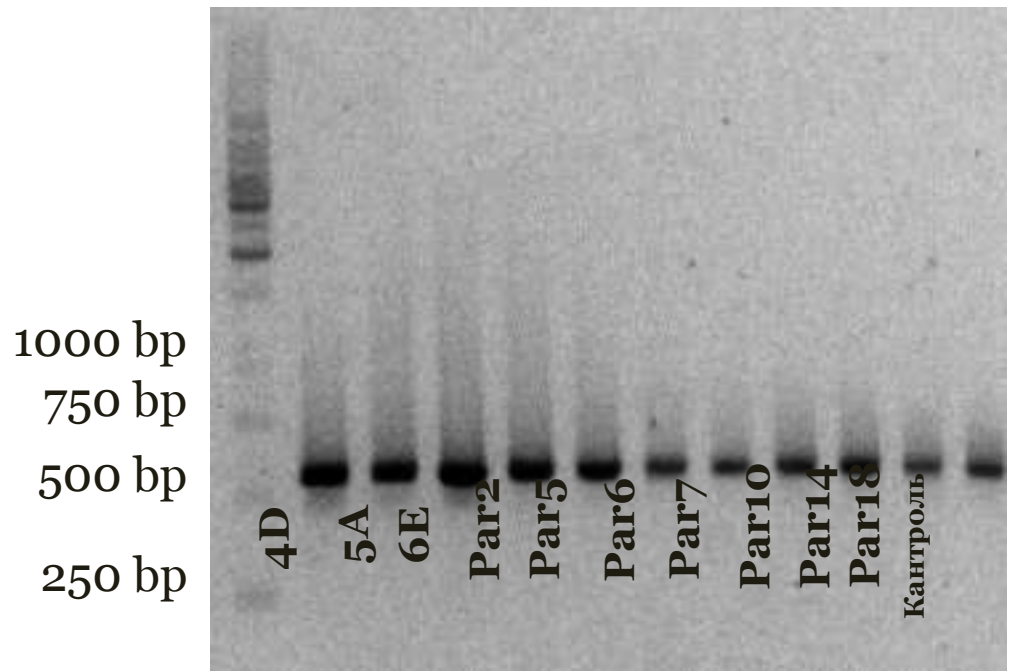


0.02

Гены біядэградацыі ПАВ і алканаў у радакокаў



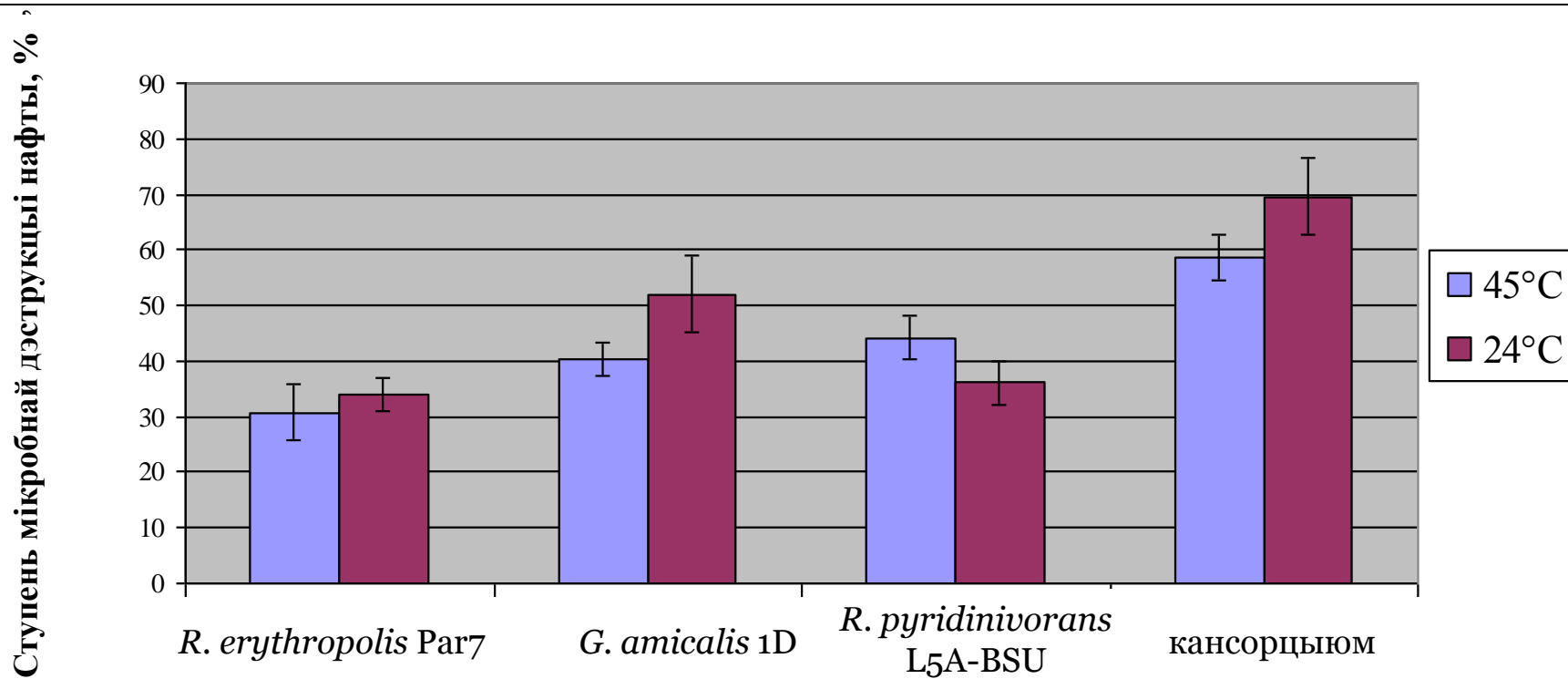
Электрафараграма ампліконаў генаў алкан монааксігеназы *alkB* (памер прадукту 550 bp) у *Rhodococcus*



Электрафараграма амплікона гена *parAa* (вялікай суб'адзінкі нафталін дыаксігеназы) штама *R. pyridinivorans* L5A-BSU.

Праверка эфектыўнасці кансорцыюма ў грунтовых мадэльных сістэмах

Умовы эксперыменту: грунт (пясок), вільготнасць 10%, канцэнтрацыя солі 3%, канцэнтрацыя нафты 2%. Інакулят уносілі да канчатковай колькасці 10^4 КУА/г грунту. Эксперымент працягваўся 21 содні як пры 24°C , так і пры 45°C .



Абіятычныя страты нафты ў сістэмах склалі 20% і 33% адпаведна пры тэмпературы 24°C і 45°C

Здольнасць штамаў кансорцыюма да ўтылізацыі нафты пры канцэнтрацыі солі ў асяродзі да 15% і канцэнтрацыі нафты да 20%

Штам	Канцэнтрацыя марской солі									
	3%		5%		7%		10%		15%	
	24°C	45°C	24°C	45°C	24°C	45°C	24°C	45°C	24°C	45°C
<i>Gordonia amicalis</i> 1D	++	+	+	+	±	+	+	±		
<i>Rhodococcus erythropolis</i> Par7	++	+	+	+	+					
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> L5A-BSU										

Кансорцыюм эфектыўны пры канцэнтрацыі солі да 7% і нафты да 10%

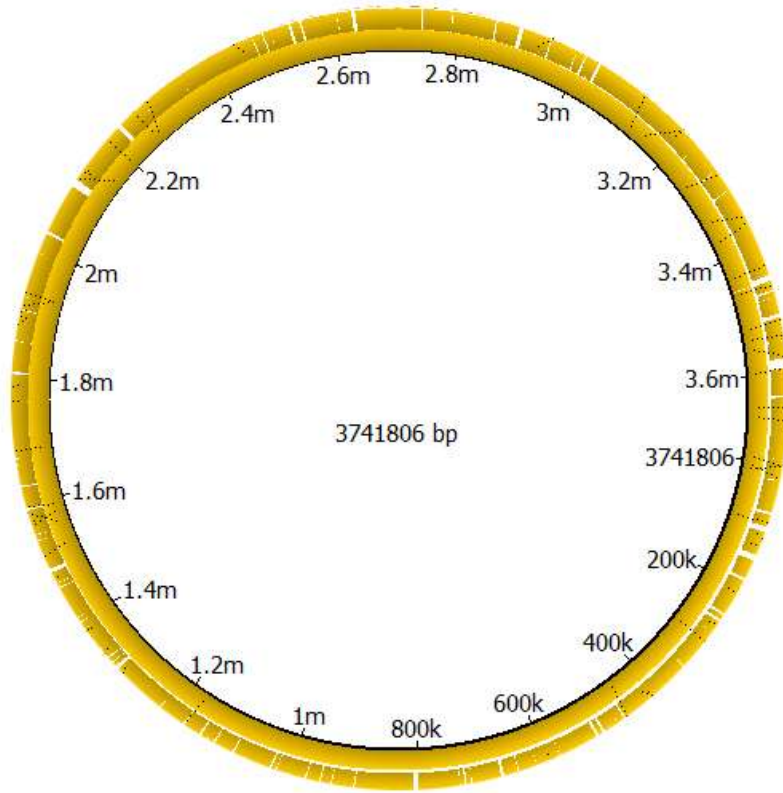
	Канцэнтрацыя нафты							
	5%		10%		15%		20%	
	24°C	45°C	24°C	45°C	24°C	45°C	24°C	45°C
<i>Gordonia amicalis</i> 1D	+	+	+	+	+	±	±	
<i>Rhodococcus erythropolis</i> Par7	+	+	+	+	±	±		
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> L5A-BSU	+	+	+	+	+	±		

Штамы дэпаніраваны ў ВКМ як *Gordonia amicalis* 1D ВКМ Ас-2720 Д, *Rhodococcus erythropolis* Par7 ВКМ Ас-2722 Д, *R. pyridinivorans* L5A-BSU ВКМ Ас-2721 Д. Створана заяўка на патэнт на консорцыюм тэрматалерантных штамаў для дэградацыі нафты і нафтапрадуктаў у грунтах і водах ва ўмовах гарачага клімату (Дэлеган Я.А., Ветрава А.А., Іванова А.А., Чарняўская М.І., Ціток М.А., Філонаў А.Я., Баронін А.М.)

ФОРМУЛА ВЫНАХОДКІ

Консорцыум бактериальных штаммов *Gordonia amicalis* ВКМ Ас-2720 Д, *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2722 Д, *R. pyridinivorans* ВКМ Ас-2721 Д для деструкции нефти и нефтепродуктов в грунтах и водах в регионах с жарким климатом, отличающийся тем, что способен утилизировать нефть и нефтепродукты в диапазоне температур 20-50°C и при солёности среды до 7%, в диапазоне рН 6-8, при влажности грунта около 10% и концентрации нефти в грунте/воде до 10%.

Аналіз геномаў тэрматалерантных штамаў, выдзеленых з узору вады падлёднага возера ў Антарктыдзе



Памер геному, bp	3741806
ГЦ, %	41,5
тРНК	100
рРНК (5S, 16S, 23S)	24
CDS	3602
Функцыянальныя блокі	Колькасць генаў
рухавасць клетак	3
спаруляцыя	171
транспорцеры	352
цэнтральныя метабалічныя шляхі	60
невядомая функцыя	693
рэплікацыя, рэпарацыя	62
транскрыпцыя	253
бялкі цеплавога шоку	9

ВЫСНОВЫ

1. Былі ахарактарызаваныя і ідэнтыфікаваныя тэрматалерантныя штамы, выдзеленыя з узораў вады, грунту і буравога раствору з радовішчаў нафты ў Казахстане і Расіі
2. Быў створаны кансорцыюм трох штамаў, якія належаць да радоў *Rhodococcus* і *Gordonia*, праверана стабільнасць кансорцыюма і пацверджана ягоная эфектыўнасць у мадэльных сістэмах з вадой і з грунтам. У вадкім асяроддзі кансорцыюм утылізаваў 68% і 38% нафты за 14 содняў пры 24°C і 45°C адпаведна, у грунце кансорцыюм утылізаваў 70% і 59% нафты пры 24°C і 45°C адпаведна.
3. Выяўлена, што штамы *Gordonia* адначасова маюць дзве генетычныя сістэмы, якія кадзіруюць ферменты дэструкцыі алканаў. Гены абедзвюх сістэмаў знаходзяцца на храмасоме. У штама *R. pyridinivorans* L5A-BSU выяўлена наяўнасць генаў дэструкцыі нафталіну, па нуклеатыдных паслядоўнасцях падобных да генаў *R. oracis*. Здольнасць да дэструкцыі нафталіну лёгка губляецца ў неселектыўных умовах. Мы мяркуем, што нафталінавыя гены змяшчае транспазонападобная структура ў складзе храмасомы штама.
4. Створана заяўка на патэнт на кансорцыюм тэрматалерантных штамаў для дэградацыі нафты і нафтапрадуктаў у грунтах і водах ва ўмовах гарачага клімату.
5. З узору вады падлёднага возера ў Антарктыдзе былі выдзеленыя дзве тэрматалерантныя бактэрыі, ідэнтыфікаваныя як *Bacillus pumilus* Bgen і *Arthrobacter* sp. 41-45 і здольныя да ўтылізацыі адпаведна ПАВ і алканаў. Геномы штамаў былі секвенаваныя і часткова анатаваныя.

**Шчыра дзякую
за ўвагу!**

