

Невидимые защитники Байкала



Байкал, самое большое в мире пресноводное озеро, уникален не только своими размерами и глубиной, но и удивительной чистотой вод. Вместе с тем, ежегодно из глубинных месторождений на поверхность озера поднимается несколько тонн нефти. Однако нефтяное загрязнение не распространяется по всему озеру, что свидетельствует о наличии природных механизмов очищения. Эту работу производят специальные бактерии, использующие нефтяные углеводороды в качестве пищевого субстрата. Такие микроорганизмы представляют особый интерес для самых разных биотехнологических целей – от очистки воды до органического синтеза

Нефть в озере мирового наследия – само это словосочетание привлекает внимание и вызывает особый интерес представителей различных научных специальностей.

Первые упоминания о байкальской нефти встречаются в работах известного исследователя Байкала, немецкого натуралиста Йохана Георги (1729–1802), однако лишь спустя два столетия она стала предметом всестороннего изучения.

Относительно недавно сибирские ученые установили в байкальских нефтях высокое содержание реликтовых циклановых углеводородов, которые в значительной мере наследуют структуру своих предшественников – липидов, входящих в состав живых организмов. Так было доказано заведомо биогенное происхождение нефти Байкала. Кроме того, в составе нефти обнаружены специфические продукты бактериального окисления углеводородов (Каширцев и др., 2006; Конторович и др., 2007).

В 1980-е гг. углеводородокисляющие микроорганизмы Байкала стали предметом изучения сотрудников Лимнологического института СО РАН (Талиев и др., 1985; Гоман и др., 1986; Петрова и Мамонтова, 1986). Новый виток в изучении этой необычной байкальской микрофлоры был инициирован открытием нового глубоководного выхода нефти, по всем параметрам отличающегося от известных ранее.

Новый выход нефти вблизи мыса Горевого Утес (Средний Байкал) открыт благодаря анализу спутниковых снимков. В 2003 г. на льду Байкала впервые заметили темное пятно диаметром около 1 км, а последующие наблюдения показали, что оно появляется регулярно.

В июле 2005 г. в этом районе на поверхности воды были обнаружены многочисленные пятна нефти, а эхолотирование показало наличие подводной акустической аномалии – факела высотой около 500 м (Хлыстов и др., 2007).

Оказалось, что из донных осадков этих двух районов в воды Байкала ежегодно поступает 2–4 т нефти (Конторович и др., 2007). Тем не менее, загрязнение вод



ПАВЛОВА Ольга Николаевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии Лимнологического института СО РАН (Иркутск).

Автор и соавтор 15 научных работ и одного патента РФ.

Победитель конкурса на право получения грантов президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых (2010)

Ключевые слова: озеро Байкал, нефтяное загрязнение, микроорганизмы, биodeградация, биосурфактанты
Key words: Lake Baikal, oil seepage, microorganisms, biodegradation, biosurfactants



Это не просто грязь, а керны донных осадков Байкала, из которых отбирают пробы для химических и микробиологических анализов с учетом глубины залегания отложения.
Фото В.Короткоручко (Иркутск)

озера наблюдается на ограниченном пространстве, что указывает на наличие интенсивных механизмов естественного очищения.

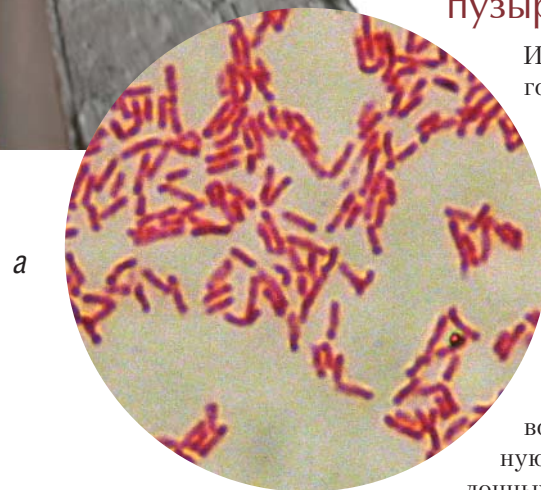
Знания о жизнедеятельности микроорганизмов, обеспечивающих чистоту воды в условиях нефтяного загрязнения, их филогенетическом разнообразии на момент открытия новых нефтепроявлений были ограничены данными, опубликованными в научной литературе. Причем последние в основном касались исследований, выполненных на примерах нефтяных резервуаров или других природных экосистем мира.

Поэтому с 2004 г. в Лимнологическом институте СО РАН начали целенаправленное изучение микроорганизмов, играющих такую значительную роль в процессах естественной биodeградации байкальской нефти.

Создатели мыльных пузырей

Исследования микробного сообщества в двух новых нефтепроявлениях позволили установить закономерности пространственного распределения углеводородоокисляющих микроорганизмов. Наиболее высокая их плотность отмечена в поверхностных пробах воды, содержащей нефтяную пленку, а также в придонных слоях и донных осадках (Павлова и др., 2008).

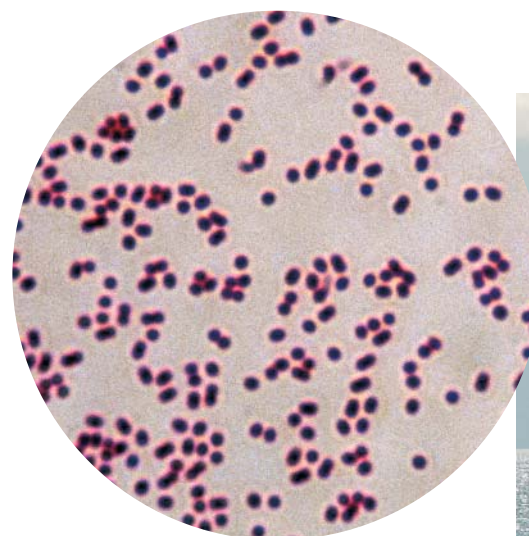
Начало исследованиям углеводородоокисляющих микроорганизмов, ответственных за исчезновение нефтяных пятен с водной поверхности, было положено около ста лет назад (Söhngen, 1913), однако и сейчас поиск и селекция природных микроорганизмов-деструкторов веществ, входящих в состав нефти, остается одной из важных задач прикладной микробиологии



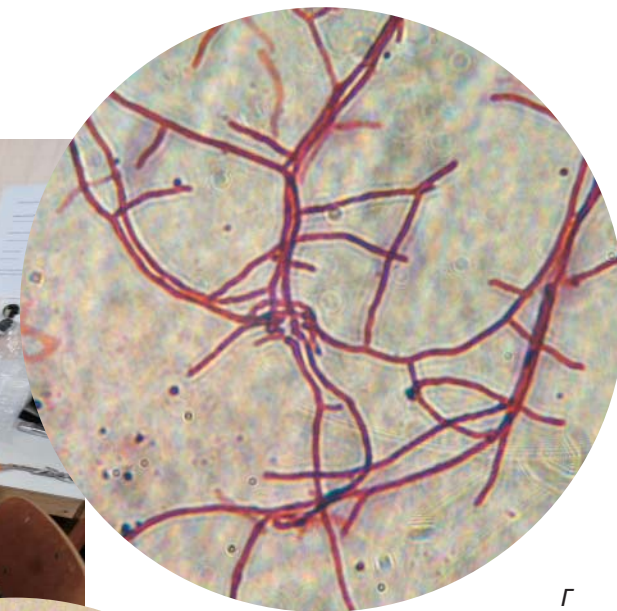
а



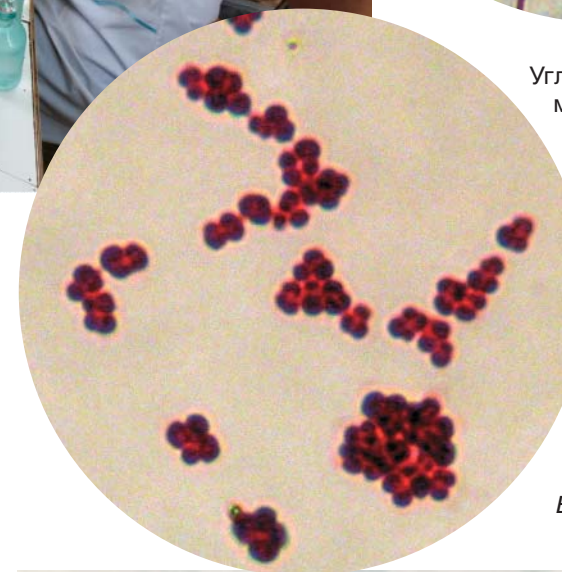
На борту научно-исследовательского судна «Верецагин» есть мини-лаборатория, где можно сразу же после отбора свежих проб сделать серию экспресс-анализов.
Фото В.Короткоручко (Иркутск)



б



г



Углеводородоокисляющие микроорганизмы, обитающие в Байкале, отличаются большим таксономическим и морфологическим разнообразием:
а) *Rhodococcus* sp.;
б) *Acinetobacter* sp.;
в) *Micrococcus* sp.;
г) *Micromonospora* sp.
Световая микроскопия

в





Углеводороды (в том числе и *n*-гексадекан, используемый в экспериментах) практически нерастворимы в воде, поэтому они формируют на поверхности воды в спокойных условиях пленку, а при встряхивании – достаточно крупные капли



Обнаруженные штаммы углеводородокисляющих микроорганизмов составили уникальную «живую» коллекцию. Все ее «экспонаты» возникли в результате длительной эволюции и адаптации к совершенно особым экологическим условиям Байкала, с его большими глубинами, длительным ледовым периодом и, главное, очень низкой среднегодовой температурой водной толщи (+3,4 °C).

При изучении их генетического разнообразия у большинства (86 %) штаммов детектированы *alk* гены, отвечающие за окисление широкого спектра *n*-алканов (Ломакина и др., 2009).

Начался поиск наиболее активных и устойчивых к воздействию нефти штаммов, пригодных для биотехнологических целей – со-

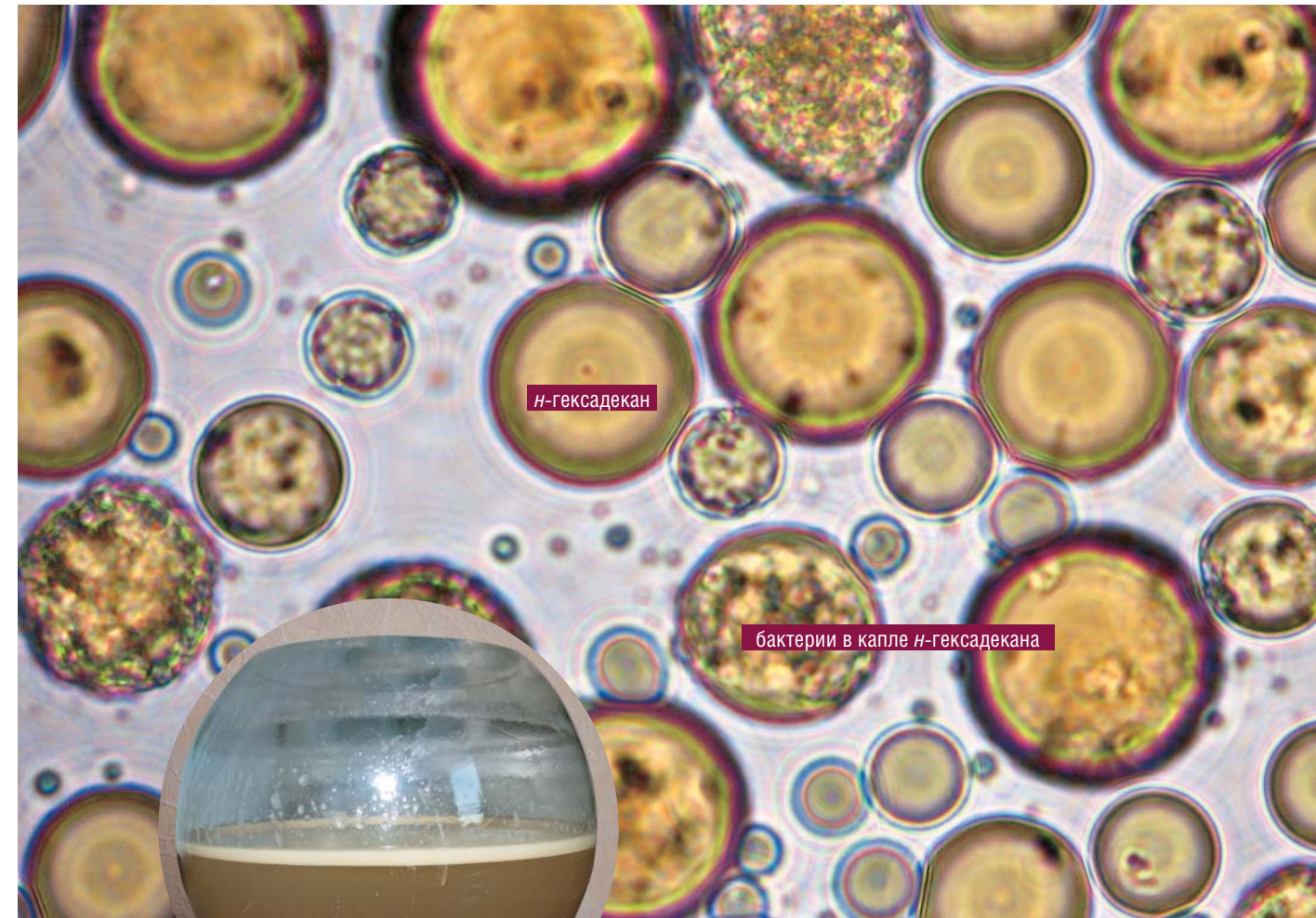
здания ассоциации микроорганизмов-деструкторов нефтяных загрязнений.

Такие виды должны обладать способностью продуцировать *сурфактанты* – вещества, снижающие поверхностное натяжение жидкости и облегчающие образование эмульсии (мелких капелек одной жидкости в другой). Другое название для сурфактантов – *поверхностно-активные вещества* (ПАВ). Эти соединения в обязательном порядке входят в состав любого стирального порошка или моющего средства.

Многие микроорганизмы и некоторые растения способны продуцировать ПАВ. Чтобы отличать сурфактанты биогенного происхождения от искусственно синтезируемых, в названии первых используется приставка *био*-.

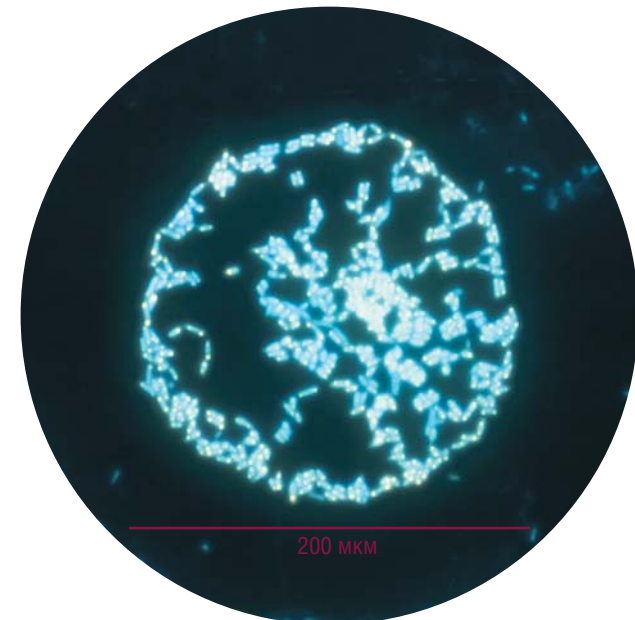
В настоящее время био-ПАВ привлекают значительное внимание как в теоретическом, так и практическом плане. Это обусловлено широкими возможностями их использования в нефтедобывающей, горнодобывающей, химической, фармацевтической и пищевой промышленности, а также для очистки окружающей среды от загрязняющих веществ, прежде всего углеводородов и тяжелых металлов.

Биосурфактанты не только не уступают по эффективности синтетическим, но и обладают существенными преимуществами: они способны быстро разрушаться в природной среде и не токсичны. К тому же био-ПАВ получают из возобновляемых источников сырья, что делает их перспективными для



Вещества-сурфактанты, выделяемые углеводородокисляющими бактериями р. *Rhodococcus*, способствуют уменьшению поверхностного натяжения, что облегчает им проникновение внутрь углеводородных капель. Сами капли при этом дробятся, образуя мелкодисперсную эмульсию. Через четверо суток культивирования бактерий на среде с добавлением гексадекана их биомасса выросла до $4,8 \cdot 10^8$ клеток/мл (вверху) Световая микроскопия

Колония бактерий рода *Rhodococcus* во внутреннем объеме углеводородной капли Эпифлуоресцентная микроскопия



разработки новых экологически безопасных технологий (Гоготов и др., 2006).

Холод не помеха

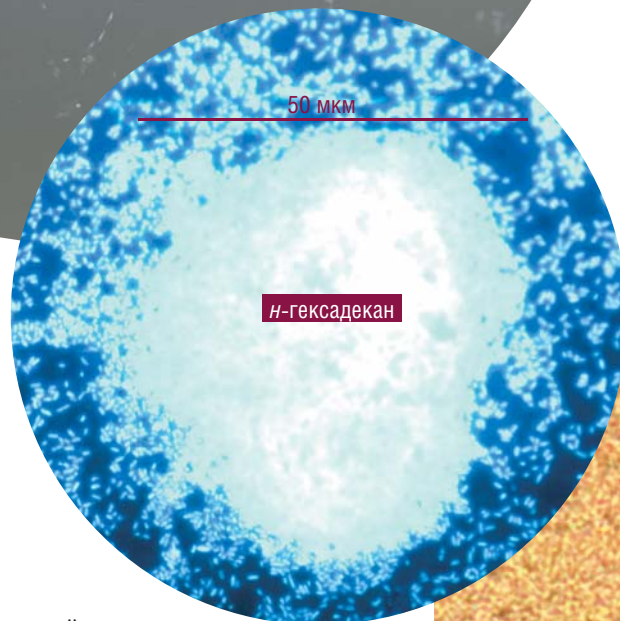
Изучением и селекцией углеводородокисляющих микроорганизмов в мире занимаются достаточно широко. За последние десятилетия были разработаны и предложены для практического использования несколько десятков бактериальных препаратов, предназначенных для интродукции такой микрофлоры в загрязненные нефтью водоемы.

Однако способность большинства бактерий-деструкторов перерабатывать нефть и нефтепродукты значительно снижается при низких (менее +10 °С) температурах. Исследований, посвященных выделению и селекции микроорганизмов, способных функционировать в таких условиях, немного. Байкальские же бактерии-нефтедеструкторы изначально адаптированы к очень низким положительным температурам среды.

В лабораториях ЛИН СО РАН была исследована способность к синтезу сурфактантов двух видов байкальских углеводородокисляющих бактерий: *Rhodococcus erythropolis* и *Pseudomonas fluorescens*. Для этого штаммы культивировали в воде с добавлением минеральных веществ и углеводорода *n*-гексадекана (его доля в нефти – одна из наиболее высоких).

После четырехдневной культивации биомасса бактерий значительно возросла. С помощью световой

Через четверо суток культивирования углеводородокисляющих бактерий рода *Pseudomonas* на среде с добавлением гексадекана их биомасса выросла до $3 \cdot 10^9$ клеток/мл. С помощью микроскопического анализа можно увидеть, как бактерии адгезируют (прилипают) на поверхности углеводородных капель. Световая микроскопия (внизу) и эпифлуоресцентная микроскопия (слева)



и флуоресцентной микроскопии удалось показать, что на 4-е сутки эксперимента клетки *R. erythropolis* проникли непосредственно внутрь капель углеводорода, а клетки *P. fluorescens* локализовались на их поверхности. Схожие результаты получили другие исследователи (Звягинцева, 2001). Так, бактерии рода *Rhodococcus* при микроскопическом анализе сначала обнаруживались на поверхности капель *n*-алкана, а по мере дальнейшей утилизации субстрата – внутри углеводородных капель.

Способность микроорганизмов синтезировать биосурфактанты стандартно оценивают по снижению уровня поверхностного натяжения на границе жидкая среда–воздух. Уже первые эксперименты показали, что эта величина водной эмульсии липидного экстракта биомассы *R. erythropolis* за время культивации снижалась примерно на 27 мН/м, а *P. fluorescens* – на 19 мН/м.

Эти данные подтверждают, что байкальские штаммы синтезируют значительные количества сурфактантов и могут считаться перспективными в качестве продуцентов био-ПАВ.

Таким образом, в результате работы коллектива специалистов ЛИН СО РАН в районах естественных выходов байкальской нефти было обнаружено и всесторонне изучено микробное сообщество, вносящее значительный вклад в процесс естественного самоочищения вод озера от нефтяного загрязнения.

Полученные результаты важны не только в фундаментальном плане. В перспективе – создание биопрепаратов из аборигенных, адаптированных к существованию в низкотемпературных условиях микроорганизмов-деструкторов нефтяных загрязнений. Ведь масштаб нефтяного загрязнения водоемов планеты неуклонно растет, а холодные северные регионы в этом плане особенно уязвимы.

Работа поддержана грантом Президента РФ «МК – 1901.2010.5»

Самое чистое озеро планеты остается таким и благодаря огромной армии микроскопических санитаров – бактерий-нефтедеструкторов
Фото М. Панфилова

Литература

Конторович А.Э., Каширцев В.А., Москвин В.И. и др. Нефтегазоносность отложений озера Байкал // Геология и геофизика. 2007. Т. 48, № 12. С. 1346–1356.

Ломакина А.В., Павлова О.Н., Шубенкова О.В., Земская Т.И. Разнообразие культивируемых аэробных микроорганизмов в районах естественных выходов нефти на оз. Байкал // Изв. РАН. Сер. биол. 2009. Т. 5. С. 515–522.

Павлова О.Н., Земская Т.И., Горшков А.Г. и др. Сравнительная характеристика микробных сообществ двух районов естественных нефтепроявлений озера Байкал // Изв. РАН. Сер. биол. 2008. Т. 3. С. 333–340.

Хлыстов О.М., Горшков А.Г., Егоров А.В. и др. Нефть в озере мирового наследия // Докл. РАН. 2007. Т. 414, № 5. С. 656–659.

В публикации использованы фото автора