

УДК 577.6:574.635; 574.6:628.35

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА ОРГАНИЧЕСКОМ СОРБЕНТЕ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ОЧИСТКИ ВОДЫ ОТ НЕФТИ

Морозов Н.В., Хуснетдинова Л.З., Жукова О.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, e-mail: Morozov_nv@mail.ru

Исследована возможность интенсификации процессов деструкции нефти иммобилизованными клетками нефте- и углеводородокисляющих микроорганизмов на органических субстратах. В качестве сорбентов-носителей использовали отходы производства растительного происхождения, такие как шелуха гречихи и ячменя. Произведена оценка эффективности деструкции нефти и ее компонентов искусственно созданными консорциумами углеводородокисляющих микроорганизмов, относящихся к родам: *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium* и *Bacillus*. Ассоциации культур микроорганизмов, состоящих из нескольких видов культур, способны разрушать более сложные по составу нефтепродукты, чем отдельные монокультуры, так как разнообразие фракционного состава сырой нефти требует применения комплекса микроорганизмов, способных разлагать широкий спектр углеводородов. Показано, что применение шелухи гречихи и ячменя в качестве носителя для иммобилизации консорциума нефтеокисляющих бактерий, способствует более ускоренной интенсификации биодegradации нефти в воде, чем при использовании суспендированных клеток. Очевидно, это определяется созданием сорбентами активной поверхности соприкосновения с искомым загрязнением и углеводородокисляющими микроорганизмами. Анализ развития нефтеокисляющих бактерий в опытах с сорбентом шелухи гречихи выявил, что последние обладают более высокой скоростью роста на нефти, так как шелуха гречихи содержит множество питательных веществ, фосфолипиды, кислоты. Проведенные исследования подтверждают возможность широкого применения органических сорбентов для иммобилизации искусственно созданного сообщества гетеротрофных микроорганизмов, обеспечивающих высокую степень биодegradации нефти и нефтепродуктов в загрязненных природных и сточных водах.

Ключевые слова: нефть, микроорганизмы, сорбент, иммобилизация, деструкция, культура

USE IMMOBILIZATION ON THE ORGANIC SORBENT OF PETROOXIDIZING MICROORGANISMS FOR WATER TREATING FROM OIL

Morozov N.V., Khusnetdinova L.Z., Zhukova O.V.

The Kazan (volga region) federal university, Kazan, e-mail: Morozov_nv@mail.ru

Possibility of an intensification of processes destruction oil immobilization by cages petro- and carbon acid microorganisms on organic substrata is investigated. As sorbents-carriers used phytogenesis production wastes, such as a buckwheat and barley peel. The efficiency estimation деструкции oil is made and its components is artificial the created consortia oil acid the microorganisms concerning sorts: *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium* and *Bacillus*. Associations of cultures of the microorganisms consisting of several kinds of cultures are capable to destroy more difficult on structure oil products, than separate monocultures as a variety of fractional structure of crude oil demands application of a complex of the microorganisms, capable to decompose a wide spectrum of hydrocarbons. It is shown that application of a peel of a buckwheat and barley as the carrier for an immobilization of a consortium of petrooxidizing bacteria, promotes more accelerated intensification of biodegradation of oil in water, than at use suspensions cages. Obviously, it is defined by creation by sorbents of an active surface of contact with required pollution and petrooxidizing microorganisms. The development analysis oil acid bacteria in experiences with a sorbent of a peel of a buckwheat has revealed that the last possess higher growth rate on oil as the buckwheat peel contains set of nutrients, phospholipids, acids. The conducted researches confirm possibility of wide application of organic sorbents for an immobilisation is artificial the created community petrooxidizing the microorganisms providing high degree of biodegradation of oil and oil products in polluted natural and sewage.

Keywords: oil, microorganisms, sorbent, immobilization, destruction, culture

В комплексе первоочередных задач по оздоровлению природной среды (водных и земельных ресурсов) от загрязнения ксенобиотиками, в том числе нефтью и нефтепродуктами, особое место принадлежит методам, основанным на управляемом применении отселектированных штаммов нефте- и углеводородокисляющих микроорганизмов (НиУОМ).

Установлено, что все или почти все углеводороды низкомолекулярной фракции нефти в сравнительно короткие сроки активно подвергаются метаболическому расщепле-

нию: одни за счет испарения, растворения, а другие за счет ферментативной активности углеводородокисляющих микроорганизмов. Намного более сложные и длительные превращения в загрязненной среде претерпевают компоненты высокомолекулярной фракции нефти. Эти вещества не могут быть метаболизированы отдельными микроорганизмами, и их деструкция в природных условиях связывается с действием смешанных популяций микроорганизмов, т.е. сообществ, для которых характерны отношения кооперации, комменсализма и взаимопомощи.

Как показали наши исследования по утилизации нефти и нефтепродуктов с использованием аборигенных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов, наибольшая степень деструкции нефти и нефтепродуктов достигалась в том случае, если в состав биопрепарата входили несколько штаммов-деструкторов [2, 5].

Выяснено, что в сложных сообществах микроорганизмы способны осуществлять совместную «метаболическую атаку» на субстрат. Отдельные члены такого сообщества, в отличие от сообщества в целом, не обладают метаболической активностью, необходимой для полного разрушения данного соединения. В результате совместной метаболической активности синтезируется достаточно эффективный для деструкции сложного полимера ферментативный комплекс.

Для создания высокоактивных искусственных ассоциаций культур бактерий необходимо учитывать взаимоотношения между микроорганизмами. При этом обязательно, чтобы ассоциация состояла только из активных нефтедеструкторов. Возможно, наиболее активной будет ассоциация, состоящая из нескольких активных нефтедеструкторов (ориентированных на разные фракции) и нескольких гетеротрофных микроорганизмов, не обладающих углеводородокисляющей способностью, но способных ассимилировать продукты промежуточного окисления углеводов, часто токсичных для углеводородокисляющих организмов [1].

Создание управляемых ассоциаций НиУОМ, иммобилизованных на органических субстратах, одно из необходимых направлений исследований, направленных на разработку биотехнологических приемов и способов повышения эффективности процессов деструкции нефти и ее производных в природных водоемах, в очистке и доочистке технологических нефтесодержащих сточных вод, а также загрязненных нефтью земель сельскохозяйственного или иного пользования.

В развитие темы целью настоящей работы явилось изучение активности искусственно созданных ассоциаций (консорциумов) аэробных и анаэробных углеводородокисляющих микроорганизмов, иммобилизованных на органических субстратах растительного происхождения, приводящие к наиболее полной деструкции нефтяных загрязнений.

В качестве сорбентов для иммобилизации НиУОМ, наиболее перспективным является естественное органическое сырье растительного происхождения [4, 5]. К по-

следнему относятся сорбенты, созданные на основе шелухи злаковых культур: гречихи, ячменя, пшеницы и др. В представленной статье рассматриваются сорбенты-носители на основе шелухи гречихи и шелухи ячменя.

Материал и методы исследования

Объектами исследований служили аборигенные штаммы нефте- и углеводородокисляющих микроорганизмов, выделенные из разнообразных природных объектов, относящихся к родам: *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium* и *Bacillus*.

Для иммобилизации клеток в качестве сорбентов – носителей использовали гранулы с гречишной шелухой (ГШ) и ячменной шелухой (ЯШ) при заданном размере 0,1 мм и концентрации 2–5 мг/л.

В качестве единственного источника углерода применяли товарную нефть Альметьевского месторождения Республики Татарстан в концентрации 0,5% (по объему).

Количественное определение остаточной нефти, для оценки нефтедеструктивной активности микроорганизмов, определяли гравиметрическим (весовым) методом, после ее экстракции четыреххлористым углеродом.

Деструкцию нефти, иммобилизованными и свободными суспендированными (для сравнения) клетками культур, осуществляли путем аэробного культивирования с использованием питательной среды Раймонда.

Иммобилизацию клеток бактерий проводили с использованием гранул агар-агара с добавлением ГШ и ЯШ. Получившиеся гранулы переносили в цилиндр на 50 мл с бактериальной суспензией. Для проведения адсорбционной иммобилизации [3, 6] клетки однофазной культуры центрифугировали 3–4 тыс. об./мин в течение 10–15 мин при 20–22 °С. Далее отмывали в физиологическом растворе (рН = 7,2) и готовили суспензию, содержащую 10⁸–10⁹ колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл. Полученной бактериальной суспензией объемом 1 мл смачивали 1 см³ носитель. Процесс сорбции проводили в статических условиях при температуре 28 °С в течение 2 ч, далее при температуре 4 °С в течение 3 ч.

В качестве контроля использовали колбы со средой и нефтепродуктами без микроорганизмов.

В экспериментах с ассоциациями колбы заседали тремя и десятью культурами. Опыты проводили в трех повторностях.

Результаты исследования и их обсуждение

Опытами установлено, что эффективность процесса биодegradации пленочной нефти выше в опытах с применением клеток микроорганизмов, иммобилизованных на гранулах с ГШ и ЯШ по сравнению с суспендированными клетками. При этом пленка превращалась во множество мелких частиц размером от 0,1 до 0,4 мм в диаметре, которые впоследствии оседали на дно.

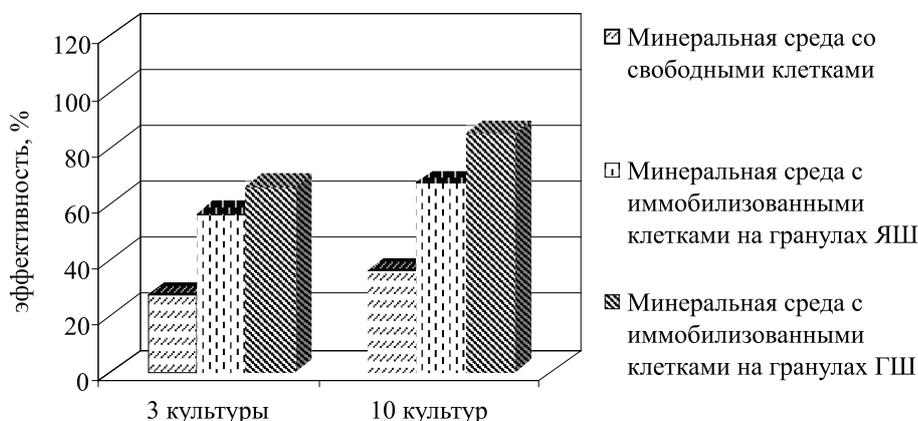
Из наблюдений следует, что в процессе культивирования смешанных форм микро-

организмов в суспендированном и иммобилизованном состояниях, на минеральной среде с внесением товарной нефти, происходило постепенное возрастание плотности бактериальной массы. Это отражалось в увеличении численности нефтеокисляющих бактерий в среде, что не констатировано в контроле. Балансовые расчеты по окисленной нефти по этим опытам также выявили, что наиболее высокая деструкция наблюдается с применением в качестве сорбентов ГШ и ЯШ. С тремя культурами (предварительный опыт) НиУОМ, адсорбированными на гранулах с ГШ, нефтедеструкция составляла 66%, с применением ЯШ доходило до 56,17%, а со свободными культурами не превышала 27,3%. Очевид-

но, это определяется созданием сорбентами активной поверхности соприкосновения с искомым загрязнением и углеводородоокисляющими микроорганизмами.

В последующих опытах эксперименты проводили с консорциумом десяти видов нефтеокисляющих бактерий. ГШ и ЯШ использовали в той же пропорции и концентрации, что и предыдущем опыте. Иммобилизацию НиУОМ осуществляли согласно описанной выше методике.

Как видно из рисунка в вариантах с 10 культурами, иммобилизованными на гранулах ГШ, окисление нефти составляло 85%, с использованием ЯШ не превышала – 67,17%, а со свободными культурами – 35,7%.



Деструкция нефти ассоциациями культур микроорганизмов в суспендированном и иммобилизованном состояниях

Анализ развития нефтеокисляющих бактерий в опытах с сорбентом ГШ, выявил, что последние обладают более высокой скоростью роста на нефти и высокой степенью иммобилизации клеток на данном органическом носителе. Стабильное увеличение численности, в конечном итоге, отражается на скорости и полноте биodeградации нефти. Действительно, при применении ГШ всегда наблюдается высокая степень усвоения нефти микроорганизмами.

По всей вероятности ГШ выступает наилучшим активным биостимулятором жизнедеятельности углеводородоокисляющих микроорганизмов, чем шелуха ячменя (в ее состав входит наименьшее количество углеводов, липидов).

Известно [7], что шелуха гречихи содержит в себе множество питательных веществ – 23 элемента в разных концентрациях с преобладанием калия, магния, фосфора, бора, кремния и кальция. В составе

имеются фосфолипиды и двенадцать кислот, среди которых преобладают пальмитиновая (16:0) стеариновая (18:0), олеиновая (18:1) и линолевая (18:2), широко используемые многими группами гетеротрофных бактерий. Очевидно, что органические субстраты растительного происхождения – в виде шелухи, остатков зерновых культур, могут быть широко применены как сорбенты для иммобилизации НиУОМ и выполнять роль легкоокисляемых органических веществ, действием которых достигается ускоренное очищение загрязненных нефтепродуктами вод разнообразной природы.

Исследования по применению гречишной и ячменной шелухи в качестве сорбента для иммобилизации углеводородоокисляющих микроорганизмов продолжают с целью разработки биометодов управляемой очистки поверхностных вод, а также технологических стоков от ксенобиотиков.

Список литературы

1. Кобзев Е.Н. Биодеструкция нефти и нефтепродуктов микробными ассоциациями в модельных системах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Пушкино, 2003. – 20 с.

2. Морозов Н.В., Хуснетдинова Л.З. Органические субстраты растительного происхождения и их использование для биостимуляции процессов микробальной очистки // Вестник ТГГПУ. – 2010. – № 4(22). – С. 82–86.

3. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – С. 347–354.

4. Хуснетдинова Л.З. Биодеструкция нефтяных загрязнений иммобилизованными клетками микроорганизмов // Труды научной конференции. – М.: Изд-во МПГУ, 2009. – С. 115–117.

5. Хуснетдинова Л.З., Морозов Н.В., Жукова О.В. Применение органических субстратов для иммобилизации гетеротрофных микроорганизмов, участвующих в очистке природных и сточных вод от нефти // Чистая вода. Казань: сборник материалов Конгресса. – Казань, 2010. – С. 110–113.

6. Центер И.М., Матафонова Г.Г., Батоев В.Б. Деструкция 2,4-дихлорфенола иммобилизованными клетками *Bacillus cereus* // Экология и промышленность России. – 2009. – №7. – С. 26–27.

7. Шкорина Е.Д. Состав и комплексная переработка отходов производства гречихи: автореф. дис. ... канд. хим. наук. – Владивосток, 2007. – 20 с.

Рецензенты:

Садыков Н.С., д.б.н., профессор, зав. лабораторией ФГБУ Федерального центра токсикологической, радиационной и биологической безопасности «ФЦТРБ-ВНИВИ» Министерства сельского хозяйства РФ, г. Казань;

Азимов Ю.И., д.т.н., профессор кафедры статистики и естествознания Казанского федерального университета, г. Казань.

Работа поступила в редакцию 10.10.2011.