

Т.П. Пирог, Е.В. Панасюк, Н.А. Антонюк

**ВЛИЯНИЕ МИКРОБНЫХ ПАВ *NOCARDIA VACCINII*
IMB B-7405 НА ДЕСТРУКЦИЮ НЕФТИ В ВОДЕ**

Национальный университет пищевых технологий,
г. Киев, Украина
tapirog@nuft.edu.ua

*Исследовали степень разложения нефти, а также комплексных с тяжелыми металлами нефтяных загрязнений в воде в присутствии микробных ПАВ *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. Деструкция нефти (2,6 – 6,0 г/дм³) в воде через 25 – 30 сут после обработки постферментационной культуральной жидкостью (5 – 10 объем. %), содержащей ПАВ, составляла 76 – 94%.*

Ключевые слова: деструкция нефти, ПАВ, тяжелые металлы, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405.

Введение. На сегодняшний день нефть является основным источником энергии во всем мире, вместе с тем повышается вероятность попадания этого ксенобиотика в окружающую среду, что сопровождается негативными последствиями [1]. Начиная с 1992 г., в мире произошло более 20 аварийных разливов нефти, что привело к значительному экономическому ущербу и нарушению экологического равновесия. Для устранения последствий таких аварий обычно используют физические и механические методы, однако они не всегда являются эффективными. Согласно данным Управления оценки технологий США механические методы позволяют удалить не более 10 – 15% нефти после широкомасштабной аварии [1]. Перспективными для ликвидации нефтяных загрязнений считаются биологические методы, включающие непосредственное внесение нефтеокисляющих микроорганизмов (биоаугментация) или использование различных веществ, стимулирующих природную (автохтонную) микробиоту (биостимуляция), например микробных ПАВ [2, 3]. Впервые возможность использования микроорганизмов для биодеструкции нефти в морских осадках была описана в [4].

© Т.П. Пирог, Е.В. Панасюк, Н.А. Антонюк, 2016

В последние годы интерес к микробным ПАВ постоянно повышается, что обусловлено значительным прогрессом в удешевлении технологий их производства и стремительным развитием тенденций к сохранению окружающей среды [3, 5, 6]. Благодаря экологической безопасности, способности эмульгировать гидрофобные соединения, образовывать комплексы с тяжелыми металлами и повышать эффективность деструкции ксенобиотиков микробные ПАВ могут найти широкое применение в природоохранных технологиях. Кроме того, уникальность этих метаболитов состоит в том, что их можно получать из промышленных отходов и в дальнейшем использовать для деструкции загрязняющих веществ, т.е. при производстве и применении микробных ПАВ достигается эффект "двойной" очистки окружающей среды [3, 5, 6].

Известно, что в присутствии тяжелых металлов эффективность деструкции нефти может снижаться, поэтому важной задачей является поиск методов очистки экосистем от таких комплексных загрязнений [7]. Одним из способов снижения токсического влияния металлов на клетки-деструкторы является связывание их карбонатом кальция, фосфатами, хелатирующими агентами, глинистыми минералами, а также ПАВ [8, 9].

Ранее [10] мы сообщали о выделении нефтеокисляющих бактерий *Nocardia vaccinii* К-8 (ІМВ В-7405) и использовании иммобилизованных на керамзите клеток для очистки воды от нефти (100 мг/дм³). В дальнейших исследованиях была установлена способность *N. vaccinii* ІМВ В-7405 к синтезу ПАВ [11].

Цель данной работы – исследование влияния ПАВ *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на деструкцию нефти в воде, а также комплексных с тяжелыми металлами нефтяных загрязнений.

Методика эксперимента. Основным объектом исследований являлся штамм *Nocardia vaccinii* К-8, зарегистрированный в Депозитории микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины под номером ІМВ В-7405.

Штамм *N. vaccinii* ІМВ В-7405 выращивали в синтетической питательной среде, г/дм³: NaNO₃ – 0,5, MgSO₄ · 7H₂O – 0,1, CaCl₂ · 2H₂O – 0,1, КН₂РO₄ – 0,1, FeSO₄ · 7H₂O – 0,001, дрожжевой автолизат – 0,5 объем. %. Источник углерода и энергии – глицерин в концентрации 1,0 объем. %. В качестве инокулята использовали культуру в экспоненциальной фазе роста, выращенную в среде указанного состава, содержащей 0,5% глицерина. Количество посевного мате-

риала ($10^4 - 10^5$ колонийобразующих единиц (КОЕ/см³)) составляло 5% от объема питательной среды. Культивирование бактерий осуществляли в колбах объемом 750 см³ со 100 см³ среды на качалке (320 об/мин) при 28 – 30°C в течение 120 ч.

В качестве препаратов ПАВ использовали постферментационную культуральную жидкость и супернатант. Для получения супернатанта культуральную жидкость центрифугировали (5000 g) в течение 30 мин.

Для моделирования загрязненных нефтью и металлами водоемов в пластиковую емкость вносили 2 дм³ бюветной воды, на поверхность которой наносили 6 – 15 см³ нефти, после чего добавляли суспензию клеток ($(4,9 - 9,8) \cdot 10^7$ КОЕ/см³) или препараты ПАВ в концентрации 5 – 15 объем. %, а также 0,05 – 1,0 мМ Cu²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ отдельно и в различных комбинациях в виде соответственно 1М растворов солей CuSO₄ · 5H₂O, CdSO₄ · 8H₂O и Pb(CH₃COOH)₄. В качестве источника биогенных элементов использовали диаммонийфосфат (0,01%). Далее в одном из экспериментов через 6 сут повторно обрабатывали водоемы суспензией клеток штамма ИМВ В-7405.

Общее количество живых клеток в бюветной воде в течение эксперимента (7 – 30 сут) определяли по методу Коха на мясо-пептонном агаре (МПА).

Количество нефти определяли весовым методом. Для этого осуществляли трехкратную экстракцию нефти гексаном (соотношение 1:1). Органический экстракт упаривали до постоянной массы на роторном испарителе ИР-1М2 (Россия) при 55°C и абсолютном давлении 0,04 МПа. В работе использовали нефть плотностью 0,85 г/см³ из месторождения Долина Ивано-Франковской области.

При определении защитных свойств ПАВ культуральную жидкость после выращивания штамма ИМВ В-7405 в жидкой минеральной среде до середины экспоненциальной и стационарной фазы центрифуговали (10000 g, 5 мин). Осадок клеток дважды промывали от остатков среды стерильной водопроводной водой, центрифугуя (10000 g, 5 мин), после чего ресуспендировали в исходном объеме стерильной водопроводной воды, получая клетки, лишенные ПАВ. В пробирки типа erpendorf вносили по 1,5 см³ культуральной жидкости (клетки и ПАВ) и суспензии клеток в отсутствие ПАВ. Начальную (до внесения катионов металлов) концентрацию клеток в культуральной жидкости и суспензии клеток, свободных от ПАВ, определяли по методу Коха на

МПА. Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} (0,05 – 0,5 мМ) добавляли в культуральную жидкость и суспензию клеток в виде 1М растворов солей соответственно $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COOH})_4$; выдерживали в термостате (30°C) в течение одного часа и определяли количество живых клеток по методу Коха на МПА.

Все опыты проводили в трех повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по Лакину, как описано ранее [10, 11]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Механизм действия микробных ПАВ связан с процессами десорбции, солюбилизации органических загрязняющих веществ и, как следствие, повышением их биодоступности для микроорганизмов [3, 4, 12, 13]. Предлагаются различные варианты применения микробных ПАВ для очистки, а именно: использование микроорганизмов-продуцентов ПАВ для утилизации нефти и продуктов ее переработки; очистка наиболее загрязненных участков растворами ПАВ в биореакторах; обработка загрязненной зоны растворами ПАВ для солюбилизации углеводов, что стимулирует развитие природной нефтеокисляющей микробиоты (биостимуляция) [12].

Литературные данные [13] свидетельствуют, что наиболее эффективное удаление углеводов достигается при использовании микроорганизмов, способных ассимилировать нефть с одновременным синтезом ПАВ. В связи с этим в качестве основных препаратов для нефтеочистки использовали культуральную жидкость, содержащую как клетки нефтеокисляющих бактерий *N. vaccinii* ИМВ В-7405, так и образуемые ими ПАВ.

Результаты количественного определения остаточной нефти в воде через 30 сут после обработки препаратами ПАВ штамма ИМВ В-7405 представлены в табл. 1.

Таблица 1. Показатели очистки воды от нефти препаратами ПАВ штамма *N. vaccinii* ИМВ В-7405

ПАВ	Концентрация		Степень деструкции нефти, %
	ПАВ, %	остаточной нефти, г/дм ³	
Культуральная жидкость	5	0,15±0,007	94,2
	10	0,29±0,014	88,8
	15	0,40±0,020	84,6

Продолжение табл. 1

Супернатант	5	0,45±0,022	82,8
	10	0,54±0,027	79,0
	15	0,55±0,027	79,5

Примечание. Начальная концентрация нефти в воде составляла 3,0 г/дм³. Степень деструкции нефти в контрольном (не обработанном ПАВ) варианте – 3,5%. В табл. 1–4 при определении степени деструкции нефти погрешность не превышала 5%; в табл. 1, 2, 4 экспозиция – 30 сут.

В присутствии культуральной жидкости и супернатанта степень деструкции нефти в воде составляла 79 – 94%. Максимальное разложение нефти (94%) наблюдалось при использовании невысоких (5%) концентраций препаратов ПАВ в виде культуральной жидкости. Более низкие показатели разложения нефти в воде в присутствии супернатанта (79 – 83%) по сравнению с таковыми при использовании культуральной жидкости (85 – 94%) могут свидетельствовать, что и клетки продуцента принимают участие в деструкции нефти.

Для подтверждения этого предположения на следующем этапе было изучено влияние клеток штамма ИМВ В-7405 на деструкцию нефти в воде (см. табл. 2).

Из данных, представленных в табл. 2, видно, что максимальная степень разложения нефти (до 95%) достигалась при использовании суспензии с более высокой концентрацией клеток.

Таблица 2. Влияние концентрации клеток *N. vaccinii* ИМВ В-7405 на степень деструкции нефти в воде

Концентрация клеток в суспензии, КОЕ/см ³	Кол-во процедур обработки	Концентрация остаточной нефти, г/дм ³	Степень деструкции нефти, %
$(9,8 \pm 0,5) \cdot 10^7$	1	0,14 ± 0,007	95,0
	2	0,45 ± 0,023	83,1
$(4,9 \pm 0,2) \cdot 10^7$	1	0,56 ± 0,028	79,2
	2	0,78 ± 0,14	70,8

Примечание. В табл. 2, 4 начальная концентрация нефти в воде – 2,6 г/дм³.

Вместе с тем достаточно высокий показатель деструкции нефти после обработки загрязненной воды супернатантом культуральной жидкости *N. vaccinii* ИМВ В-7405 (см. табл. 1) позволяет предположить, что основным механизмом, обеспечивающим активное разложе-

ние нефти в присутствии препаратов ПАВ, является активация ими природной нефтеокисляющей микробиоты воды. В работе [14] также отмечено, что биостимуляция автохтонной микробиоты загрязненных нефтью экосистем наблюдалась в присутствии супернатанта культуральной жидкости, содержащей ПАВ.

В связи с изложенным выше на следующем этапе анализировали количественные изменения в составе микробиоты воды в течение эксперимента. Установлено, что до загрязнения нефтью и обработки препаратами ПАВ в воде содержалось $3,6 \cdot 10^4$ КОЕ/см³. Микробиота такой воды была представлена четырьмя морфотипами колоний. Общее количество микробиоты воды к концу эксперимента увеличилось на один–два порядка в различных вариантах. Полученные данные свидетельствуют в пользу нашего предположения об активации микробиоты воды препаратами ПАВ *N. vaccinii* ИМВ В-7405.

В работе [15] показано, что после внесения поверхностно-активных рамнолипидов и биогенных элементов разложение нефти (0,8 г/дм³) в морской воде составляло 59% через пять суток, а основным механизмом деструкции являлась стимуляция рамнолипидами автохтонной морской микробиоты.

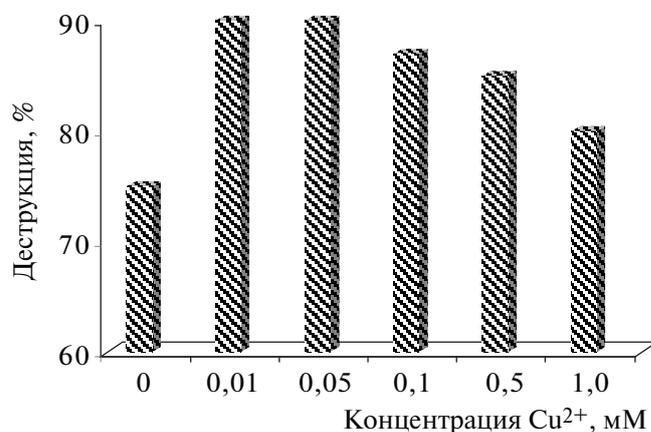
В наших предыдущих исследованиях [16, 17] была установлена возможность использования препаратов ПАВ *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 (ИМВ В-7241) и *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 для очистки воды от нефти. Через 30 сут степень деградации нефти (2,6 – 3,0 г/дм³) в присутствии 5 – 30 объем. % препаратов ПАВ в виде постферментационной культуральной жидкости или супернатанта составляла 81 – 95%. Интенсификация деструкции нефти обусловлена активацией природной нефтеокисляющей микробиоты под влиянием ПАВ штаммов ИМВ Ас-5017 и ИМВ В-7241.

Дальнейшие эксперименты показали, что при повышении концентрации нефти в воде до 6 г/дм³ степень ее деструкции в присутствии культуральной жидкости (5 объем. %) *N. vaccinii* ИМВ В-7405 снижалась незначительно (на 2 – 3%) по сравнению с показателями очистки воды, содержащей 2,6 – 3,0 г/дм³ нефти.

Тяжелые металлы являются одними из основных загрязнителей экосистем [8]; они отрицательно влияют на микроорганизмы, нарушая таким образом, биологический баланс биосферы. Чаще всего в почве и воде встречаются катионы следующих металлов: Ag, As, Be, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Sb, Ti и Zn.

Данные по деструкции нефти в воде, содержащей различные концентрации катионов меди, после обработки культуральной жидкостью *N. vaccinii* ИМВ В-7405 представлены на рисунке. В присутствии Cu^{2+} деструкция нефти через 20 сут была существенно выше, чем без катионов меди. Анализ микробиоты воды в течение эксперимента показал увеличение численности клеток, однако в присутствии катионов меди и препаратов ПАВ количество клеток было в 1,5 – 1,7 раза выше, чем без Cu^{2+} .

Далее исследовали возможность использования препаратов ПАВ штамма ИМВ В-7405 в виде культуральной жидкости для очистки воды, содержащей нефть и катионы нескольких токсических металлов (см. табл. 3).



*Влияние катионов меди на деструкцию нефти в воде (3,0 г/дм³) в присутствии культуральной жидкости *N. vaccinii* ИМВ В-7405 (5 объем. %).*

Установлено, что наиболее низкая эффективность деструкции нефти (65%) наблюдалась в загрязненной нефтью воде в присутствии смеси катионов кадмия и свинца. Отметим, что при наличии катионов меди в смеси металлов степень разложения нефти в воде повышалась. Анализ микробиоты воды показал, что в присутствии катионов меди и ПАВ общее количество клеток было в несколько раз выше, чем без Cu^{2+} (см. табл. 3). Предположено, что одним из механизмов, обуславливающих увеличение деструкции нефти в присутствии невысоких концентраций катионов меди, может быть стимуляция Cu^{2+} активности алкангидроксилаз (первых ферментов катаболизма углеводов) как штаммов-продуцентов ПАВ, так и природной

нефтеокисляющей микробиоты. Такое предположение базируется на данных литературы о том, что активаторами монооксигеназ являются катионы меди [18].

Таблица 3. Влияние культуральной жидкости *N. vaccinii* IMB В-7405 (10 объем. %) на деструкцию нефти (6,0 г/дм³) в воде в присутствии Cu^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+}

Концентрация катионов в воде, мМ			Деструкция нефти, %	Кол-во клеток, КОЕ/см ³
Cu^{2+}	Cd^{2+}	Pb^{2+}		
0	0	0	76	$(4,9 \pm 0,24) \cdot 10^5$
0	0,5	0,5	65	$(2,1 \pm 0,10) \cdot 10^5$
0,5	0	0,5	78	$(6,5 \pm 0,32) \cdot 10^5$
0,5	0,5	0	81	$(7,1 \pm 0,35) \cdot 10^5$
0,5	0,5	0,5	82	$(7,2 \pm 0,36) \cdot 10^5$

Примечание. Количество клеток в исходной воде (до внесения нефти, ПАВ и катионов металлов) составляло $(2,4 \pm 0,12) \cdot 10^3$ КОЕ/см³. Степень деструкции нефти в воде, не обработанной ПАВ и катионами металлов, – 2,0%; экспозиция – 25 сут.

Другим механизмом, лежащим в основе достаточно высокой эффективности деструкции нефти препаратами ПАВ *N. vaccinii* IMB В-7405 в присутствии катионов металлов, может быть проявление защитных функций ПАВ. Известно [3, 9], что микробные ПАВ характеризуются способностью к образованию стабильных комплексов с различными металлами. Наши эксперименты показали, что удаление ПАВ из суспензии сопровождалось гибелью всех клеток *N. vaccinii* IMB В-7405 в присутствии Cu^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+} (0,05 – 0,5 мМ), в то время как при наличии ПАВ в аналогичных условиях выживало до 60 – 70% клеток. Дальнейшие исследования показали, что ПАВ штамма IMB В-7405 проявляют защитные функции по отношению к нативной микробиоте воды. Так, выживаемость клеток после обработки катионами тяжелых металлов (0,01 – 0,05 мМ) в суспензии, содержащей ПАВ, составляла 80 – 100, а без ПАВ – 0 – 59%.

На заключительном этапе осуществляли сравнение эффективности препарата "Деворойл", состоящего из пяти углеводородокисляющих бактерий и дрожжей, с препаратами ПАВ штамма IMB В-7405 в виде культуральной жидкости (см. табл. 4).

Выбор "Деворойла" среди многих других препаратов был обусловлен тем, что он является одним из первых, появившихся на рынке, а также наиболее известным и изученным. Данные, представленные в табл. 4, показывают, что при использовании этого препарата степень деструкции нефти в воде через 28 сут составляла 68%.

Таблица 4. Биодеструкция нефти в воде при использовании препарата "Деворойл" и культуральной жидкости *N. vaccinii* IMB В-7405

Препарат	Экспозиция, сут	Концентрация остаточной нефти, г/дм ³	Степень деструкции нефти, %	Кол-во клеток, КОЕ/см ³
Деворойл	7	2,28 ± 0,11	12	(2,2 ± 0,11) · 10 ⁴
	14	1,76 ± 0,09	32	(7,2 ± 0,36) · 10 ⁴
	28	0,83 ± 0,04	68	(2,0 ± 0,1) · 10 ⁵
Культуральная жидкость штамма IMB В-7405	28	0,16 ± 0,01	94	(3,0 ± 0,15) · 10 ⁵

Примечание. Количество клеток в исходной воде (до внесения нефти и обработки препаратами) составляло $(3,2 \pm 0,16) \cdot 10^3$ КОЕ/см³.

Отметим, что в аналогичных условиях в присутствии препаратов ПАВ *N. vaccinii* IMB В-7405 наблюдали деградацию 94% нефти, а количество клеток природной микробиоты воды было больше, чем после обработки "Деворойлом".

Выводы. Таким образом, показана высокая эффективность применения невысоких (5 – 10 объем. %) концентраций препаратов ПАВ *N. vaccinii* IMB В-7405 в виде культуральной жидкости для очистки воды от нефти (2,6 – 6,0 г/дм³), в том числе и в присутствии катионов токсических металлов. Предполагается, что интенсификация деструкции комплексных нефтяных загрязнений в присутствии ПАВ и Cu^{2+} обусловлена стимуляцией автохтонной микробиоты в результате солюбилизации нефти, активацией катионами меди алкангидроксилаз как штаммов-продуцентов ПАВ, так и природной нефтеокисляющей микробиоты, и защитными функциями ПАВ.

Резюме. Досліджено ступінь розкладання нафти, а також комплексних з важкими металами нафтових забруднень у воді за присутності ПАВ *Nocardia vaccinii* IMB В-7405. Деструкція нафти (2,6 – 6,0 г/дм³)

у воді через 25 – 30 діб після обробки постферментаційною культуральною рідиною (5 – 10 об'єм. %), що містить поверхнево-активні речовини, становила 76 – 94%.

T.P. Pirog, K.V. Panasyuk, N.O. Antonyuk

EFFECT OF *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 BIOSURFACTANTS ON OIL DESTRUCTION IN WATER

Summary

The degree of oil degradation, as well as complex oil pollution with heavy metal in water in the presence of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 biosurfactants was studied. The destruction of crude oil (2,6 – 6,0 g/L) in water) at 25 – 30 days after treatment with the post-fermentative culture liquid (5 – 10% v/v) containing biosurfactant was 76 – 94%.

Список использованной литературы

- [1] *Zaki M.S., Fawzi O.M., Abd El-Zaher M.F.* // Life Sci. J. – 2013. – **10**, N 1. – P. 3329 – 3332.
- [2] *Tyagi M., da Fonseca M.M., Carvalho C.C.* // Biodegradation. – 2011. – **22**, N 2. – P. 231 – 241.
- [3] *Jawniczak J., Marecik R., Chrzanowski J.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2013. – **97**, N 6. – P. 2327 – 2339.
- [4] *Das N., Chandran P.* // Biotechnol. Res. Int. – 2011. – doi: 10.4061/2011/941810.
- [5] *Kapadia Sanket G., Yagnik B.N.* // Asian J. Exp. Biol. Sci. – 2013. – **4**, N 1. – P. 1 – 8.
- [6] *Shoeb E., Akhlaq F., Badar U., Akhter J., Imtiaz S.C.* // Acad. Res. Int. – 2013. – **4**, N 3. – P. 243 – 252.
- [7] *Olaniran A.O., Balgobind A., Pillay B.* // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – **14**, N 5. – P. 10197 – 10228.
- [8] *Sandrin T.R., Maier R.M.* // Environ. Health. Perspect. – 2003. – **111**, N 8. – P. 1093 – 1101.
- [9] *Lima T.M.S., Procopio L.C., Brandao F.D., Carvalho A.M.X., Totola M.R., Borges A.C.* // Biodegradation. – 2011. – **22**, N 5. – P. 1007 – 1015.

- [10] *Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Гречирчак Н.Н.* // Прикл. биохимия и микробиология. – 2005. – **41**, № 1. – С. 58 – 63.
- [11] *Пирог Т.П., Грищенко Н.А., Хомяк Д.И., Конон А.Д., Антонюк С.И.* // Микробиол. журн. – 2011. – **73**, № 4. – С. 15 – 24.
- [12] *Ron E.Z., Rosenberg E.* // Cur. Opin. Biotechnol. – 2002. – **13**, N 3. – P. 249 – 252.
- [13] *Singh A., van Hammer J.D., Ward O.P.* // Biotechnol. Adv. – 2007. – **25**, N 1. – P. 99 – 121.
- [14] *Pacwa-Plociniczak M., Plaza G.A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S.* // Int. J. Mol. Sci. – 2011. – **12**, N 1. – P. 633 – 654.
- [15] *McKew B.A., Coulon F., Yakimov M.M., Denaro R., Genovese M., Smith C.J., Osborn A.M., Timmis K.N., McGenity T.J.* // Environ. Microbiol. – 2007. – **9**, N 6. – P. 1562 – 1571.
- [16] *Пирог Т.П., Антонюк С.И., Сорокіна А.І.* // Мікробіол. жур. – 2009. – **71**, № 5. – С. 8 – 13.
- [17] *Пирог Т.П., Шулякова М.О., Шевчук Т.А., Софілканіч А.П.* // Біотехнологія. – 2012. – **5**, № 2. – С. 51 – 68.
- [18] *Torres Pazmino D.E., Winkler M., Glieder A., Fraaije M.W.* // J. Biotechnol. – 2010. – **146**, N 12. – P. 9 – 24.

Поступила в редакцію 26.02. 2015 г.