

Карпенко, Е.В. Перспектива использования бактерий рода *Rhodococcus* и микробных поверхностно-активных веществ для деградации нефтяных загрязнений / Е. В. Карпенко, Р. И. Вильданова-Марцишин, Н. С. Щеглова, Т.П. Пирог, И. Н. Волошина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, № 2. – С. 175–179.

УДК 759.873:615:551

**ПЕРСПЕКТИВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *Rhodococcus*
И МИКРОБНЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ
ДЕГРАДАЦИИ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ**

Карпенко Е.В.¹, Вильданова-Марцишин Р.И.¹, Щеглова Н.С.¹, Пирог Т.П.,² Волошина И.Н.²

¹ *Отделение физико-химии и технологии горючих ископаемых Института физической химии Национальной академии наук Украины, Львов, 79053, e-mail vfh@org.lviv.net*

² *Национальный университет пищевых технологий г. Киев, 01033, e-mail tapirog@usuft.kiev.ua*

Исследована возможность интенсификации процессов деструкции нефти накопительной культурой нефтеокисляющих микроорганизмов в присутствии бактерий рода *Rhodococcus* и микробных поверхностно-активных веществ (ПАВ).

Показано, что степень утилизации сырой нефти (2 об.%) к 192 ч выращивания накопительной культуры составляла 84%, а при введении в нее активного углеводородокисляющего штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 и экзогенных ПАВ, синтезируемых штаммом *Pseudomonas* sp. PS-27, повышалась до 90% и до 93-94% соответственно.

Полученные результаты являются основой для разработки высокоэффективных технологий для очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений.

Бактерии рода *Rhodococcus* известны как наиболее активные деструкторы нефтепродуктов как в естественных биотопах загрязненных объектов, так и в составе специальных биотехнологических препаратов [1 - 4]. Например, в состав ассоциации Деворойл, которая применяется для биологической очистки почв от нефтяных и других органических загрязнений, входят пять штаммов микроорганизмов, три из которых принадлежат к роду *Rhodococcus*. Клеточная оболочка *Rhodococcus* ассоциирована с липидными компонентами (гликолипидами, пептидолипидами), и поэтому имеет липофильный характер, то есть высокую аффинность к гидрофобным субстратам. Первичное взаимодействие нефтепродуктов с микроорганизмом может происходить путем их непосредственного контакта. В процессе подобного прямого взаимодействия важную роль играет строение клеточной стенки, то есть гидрофильно-гидрофобные свойства поверхности [5 - 7]. При прямом контакте углеводороды проникают в клетку в виде субмикроскопических капель. Поверхностная активность и гидрофобный характер способствуют взаимодействию между микроорганизмом и нерастворимым субстратом, что дает возможность преодолеть ограниченную диффузию при его транспорте в клетку. Адгезия клеток к гидрофобным субстратам на ранней стадии роста обеспечивает оптимальный транспорт питательных веществ.

Одним из возможных путей очистки почв и воды от нефтепродуктов является активация природной микрофлоры загрязненных объектов. Особенно целесообразен такой способ для застарелых загрязнений. Природные механизмы самоочистки способствуют развитию специфической нефтеокисляющей микрофлоры в местах длительного пребывания загрязняющих веществ. Большое значение имеет экономический аспект таких технологий, поскольку использование природной микрофлоры существенно снижает стоимость процессов очистки, не требует многотоннажного производства биопрепаратов и технических затрат на обработку. Однако при высоких концентрациях загрязняющих веществ в

почве и воде природные процессы биоутилизации проходят медленно.

Мощным регулятором активности микробной популяции, в том числе природной, которая окисляет гидрофобные соединения, являются поверхностно-активные вещества (ПАВ), в частности ПАВ микробного происхождения [8, 9]. Эмульгирование (солюбилизация) углеводов с помощью ПАВ улучшают поступление гидрофобных органических загрязнителей (ГОЗ) из почв и воды в микробные клетки и, соответственно, их деградацию [10]. Таким образом, ПАВ выполняют роль «посредников» между клеткой и ГОЗ. Поэтому целесообразным является применение поверхностно-активных компонентов или культур, которые их активно синтезируют, в технологиях и препаратах для очистки почв и воды от нефтепродуктов [11, 12].

Цель работы – исследовать возможность интенсификации процессов деструкции нефти накопительными культурами нефтеокисляющих микроорганизмов при введении в них активных штаммов бактерий рода *Rhodococcus*, а также микробных ПАВ.

МЕТОДИКА

Микроорганизмы. Как объекты исследования использовали накопительные культуры нефтеокисляющих микроорганизмов, выделенные из загрязненных нефтью образцов почвы и донных осадков шламмоотстойников месторождения «Долинанافتогаз» (Ивано-Франковская обл., Украина), а также изолированные нами ранее штаммы бактерий рода *Rhodococcus* - *Rhodococcus* sp. N 1, *Rhodococcus* sp. N 2, *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 и бактериальный штамм *Pseudomonas* sp. PS-27 [13, 14].

Получение и выращивание накопительных культур нефтеокисляющих микроорганизмов. Накопительные культуры, использующие в качестве источника углерода нефть, получали при внесении 0.5 г почвы или осадка в 10 мл минеральной среды следующего состава (г/л): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 2.0; KH_2PO_4 – 1.0; NH_4NO_3 – 3.0; NaCl – 1.0; Na_2CO_3 – 0.2;

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.02; $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ – 0.01; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.01. В качестве источника углеродного питания использовали нефть из месторождения Долина Ивано-Франковской обл. (плотность – 0.9 г/см^3) в концентрации 1 и 2 об. %. Культивирование осуществляли при $30 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 7.0, в течение 168 ч. При последовательных пересевах инокулятом служила культура из предыдущей ферментации в количестве 10% от объема. Для получения накопительных культур проводили 3-5 последовательных их пересевов на среде выше указанного состава.

Выделение чистых культур осуществляли путем рассева накопительных культур методом Коха на агаризованные среды: мясопептонная (МПА), глюкозопотомельная (ГКА) и минеральная среды с 0.01 об. % нефти или жидких парафинов. Культуральные и физиолого-биохимические свойства штаммов определяли по общепринятым тестам [15], идентификацию микроорганизмов проводили по [16].

Культивирование бактерий. Бактерии рода *Rhodococcus* выращивали на жидкой минеральной среде следующего состава (г/л): $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 2; KH_2PO_4 – 1.2; NH_4NO_3 – 4.0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 8×10^{-4} ; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 5×10^{-6} ; NaCl – 1.0; дрожжевой экстракт – 1.0; пептон – 1.0; pH 6.8-7.0. Штамм бактерий *Pseudomonas* sp. PS-27 выращивали на жидкой минеральной среде следующего состава (г/л): $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 2; KH_2PO_4 – 1.2; NaNO_3 – 3.0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5; цитрат натрия - 5.0; pH 6.8-7.2. В качестве источника углерода и энергии использовали гексадекан в концентрации 2 об. %; жидкие парафины - *n*-алканы (C_{10} - C_{14}) производства нефтеперерабатывающего завода «Галичина» (Дрогобыч, Львовская обл.) - 2 об. % и нефть из месторождения Долина Ивано-Франковской обл. (плотность – 0.9 г/см^3) – 1 и 2 об. %.

Культивирование бактерий осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 750 мл с рабочим объемом 200 мл на ротационной качалке ($n=200$ об/мин) в течение 168 ч при температуре $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

В качестве посевного материала использовали 1-2-суточные культуры, выращенные на ГКА, а также культуры из экспоненциальной фазы роста (24-48 ч), выращенные на минеральной среде с жидкими парафинами (0.5 об. %)

Биомассу определяли по оптической плотности клеточной суспензии с последующим пересчетом на сухую массу клеток по калибровочному графику или весовым методом.

Эмульгирующую активность определяли по методу, описанному в работе [8]. В качестве гидрофобной фазы для эмульгирования использовали керосин, жидкие парафины, легкую нефть (плотность 0.80 г/см^3), рапсовое и соевое масло. Измерение индекса эмульгирования (E_{24}) определяли через 24 ч как величину отношения высоты эмульсионного слоя к общей высоте жидкости в пробирке и выражали в процентах. Исследовали эмульгирующую активность культуральной жидкости, полученной после культивирования штамма *Pseudomonas* sp. PS-27 на среде с гексадеканом (2 об. %) в течение 168 ч.

При исследовании степени деструкции нефти накопительными культурами в присутствии штамма *R. erythropolis* ЭК-1 или ПАВ, синтезируемых *Pseudomonas* sp. PS-27, накопительные культуры выращивали на минеральной среде указанного выше состава, содержащей 2 об. % нефти (плотность – 0.9 г/см^3) в течение 192 ч. Количество посевного материала составляло 10 % от объема засеваемой среды.

При изучении влияния штамма *R. erythropolis* ЭК-1 на степень утилизации сырой нефти накопительными культурами микроорганизмов использовали родокок из экспоненциальной фазы роста (24 ч), выращенный на минеральной среде с 0.5 об. % жидких парафинов. Количество инокулята *R. erythropolis* ЭК-1, вносимое в среду выращивания накопительных культур, составляло 5 % от объема засеваемой среды.

При исследовании влияния экзогенных ПАВ на степень деструкции нефти накопительными культурами использовали культуральную жидкость,

полученную после выращивания штамма *Pseudomonas* sp. PS-27 на среде с гексадеканом (2 об. %) в течение 168 ч. Количество культуральной жидкости *Pseudomonas* sp. PS-1, вносимое в среду выращивания накопительных культур, составляло 10 % от объема засеваемой среды.

Остаточную нефть определяли весовым методом, а также методом инфракрасной (ИК) спектроскопии на анализаторе нефтепродуктов АН-1 (Россия) после экстракции ее гексаном из культуральной жидкости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследований изучали способность штаммов *Rhodococcus* sp. N 1, *Rhodococcus* sp. N 2, *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 и *Pseudomonas* sp. PS-27 расти на гидрофобных субстратах (жидкие парафины, гексадекан, нефть). Данные по накоплению биомассы исследуемых нефтеокисляющих бактерий в процессе культивирования на углеводородных субстратах представлены на рис. 1. Результаты экспериментов показали, что все штаммы способны ассимилировать жидкие парафины, гексадекан, нефть. Так, уровень биомассы к 168 ч культивирования исследуемых штаммов составлял 1.6-4.6 г/л. Следует отметить, что кривые роста штаммов *Rhodococcus* sp. N 1, *Rhodococcus* sp. N 2 и *Pseudomonas* sp. PS-27 на всех гидрофобных субстратах были практически одинаковыми (рис. 1). К концу культивирования этих штаммов концентрация биомассы составляла 1.6-2.9 г/л.

Штамм *R. erythropolis* ЭК-1 характеризовался более высокими значениями биомассы при росте на углеводородах - 3.5-4.6 г/л (рис. 1). Учитывая, что уровень биомассы коррелирует с активностью ассимиляции углеводородов можно рекомендовать этот штамм для повышения степени деструкции нефтепродуктов накопительными культурами микроорганизмов. Штамм *R. erythropolis* ЭК-1 представляется перспективным для проведения подобного рода исследований еще и потому, что он является продуцентом ПАВ, обладающих поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами

[13]. По химической природе ПАВ, синтезируемые *R. erythropolis* ЭК-1, представляют комплекс липидов с соединениями полисахаридно-белковой природы. В составе липидов выявлены гликолипиды (трегалозомоно- и трегалозодикориномиколаты) и общие липиды (цетиловый спирт, пальмитиновая кислота, метиловый эфир *n*-пентадекановой кислоты, триглицерид, миколовые кислоты и др) [13].

Для проведения дальнейших исследований, кроме *R. erythropolis* ЭК-1, нами был выбран также бактериальный штамм *Pseudomonas* sp. PS-27. Выбор этого штамма был обусловлен следующим. Во-первых, *Pseudomonas* sp. PS-27 способен расти на гидрофобных субстратах (рис. 1). Во-вторых, этот штамм синтезирует внеклеточные поверхностно-активные гликолипиды (рамнолипиды) и полисахарид альгинатной природы [14]. В-третьих, *Pseudomonas* sp. PS-27 характеризуется достаточно высокой ПАВ-синтезирующей способностью. Так, количество рамнолипидов и полисахаридов, синтезируемых *Pseudomonas* sp. PS-27, составляет соответственно 7.5-8.0 и 4.5-5.0 г/л.

Эмульгирование органических веществ (в том числе нефтепродуктов, масел) с помощью ПАВ определяет возможность и скорость очистки воды и почв биотехнологическими методами. В связи с этим на следующем этапе определяли эмульгирующие свойства культуральной жидкости, полученной после культивирования *Pseudomonas* sp. PS-27 на гексадекане. Как видно из представленных на рис. 2 данных, исследуемая культуральная жидкость эффективно эмульгирует целый ряд гидрофобных субстратов - индекс эмульгирования составлял 65-90%.

Одним из важных критериев оценки ПАВ при их практическом использовании является способность к эмульгированию углеводов в широком диапазоне рН. Показано, что ПАВ, синтезируемые *Pseudomonas* sp. PS-27, способны к образованию стабильных мелкодисперсных эмульсий с гидрофобными субстратами при рН от 5.5 до 10. Благодаря таким свойствам, ПАВ *Pseudomonas* sp. PS-27 можно использовать для обработки

загрязненных нефтепродуктами объектов в различных природных условиях.

Следует отметить, что ПАВ являются относительно новым продуктом биотехнологии. В последние годы появляется значительное количество работ по поиску новых высокоактивных продуцентов ПАВ. Во многих работах отмечается способность новых ПАВ существенно интенсифицировать деградацию нефтепродуктов как в лабораторных, так и полевых условиях [9, 17-19]. Как свидетельствуют литературные данные, такой способностью обладают не только ПАВ, синтезируемые родококками [3, 4, 9], но и ПАВ, образуемые *Candida antarctica* [17], неидентифицированными бактериальными штаммами, предположительно относящимися к роду *Bacillus* [18], *Flavobacterium* sp. MTN11 [19].

На заключительном этапе исследовали способность селекционированной нами накопительной культуры нефтеокисляющих микроорганизмов (№ 3) утилизировать сырую нефть в присутствии штамма *R. erythropolis* ЭК-1 и ПАВ, синтезируемых *Pseudomonas* sp. PS-27.

Из 10 образцов, загрязненных нефтью, нами было выделено 6 накопительных культур, которые при культивировании на минеральной среде с 2 об. % нефти в течение 192 ч ассимилировали до 50-80% этого субстрата. Наиболее активной оказалась накопительная культура № 3, которая была выбрана нами для дальнейших экспериментов. Было установлено, что данная накопительная культура состоит из 6 типов бактерий, которые на основе морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств были идентифицированы как представители родов *Acinetobacter*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium* и *Rhodococcus*.

Результаты, представленные на рис. 3, свидетельствуют о том, что ПАВ *Pseudomonas* sp. PS-27 интенсифицировал ассимиляцию нефти исследуемой накопительной культурой. Через 72 ч выращивания накопительной культуры содержание остаточной нефти составляло 24.1% от ее исходной концентрации, а в присутствии ПАВ снижалось до 17.2%. Введение в накопительную культуру № 3 штамма *R. erythropolis* ЭК-1 также

способствовало интенсификации процесса усвоения нефти. Так, при совместном выращивании накопительной культуры и родокока содержание остаточной нефти через 72 ч составляло 19.5%. Через 192 ч выращивания накопительной культуры содержание остаточной нефти снижалось до 15.8%; в то время как в присутствии *R. erythropolis* ЭК-1 и ПАВ *Pseudomonas* sp. PS-27 - до 10.0 и 6.4% соответственно.

Таким образом, в результате проведенной работы показана возможность интенсификации процесса деградации нефти накопительной культурой нефтеокисляющих микроорганизмов при введении в нее активного углеводородокисляющего штамма *R. erythropolis* ЭК-1, а также в присутствии ПАВ, синтезируемых штаммом *Pseudomonas* sp. PS-27.

Получены экспериментальные данные являются основой для разработки новых эффективных методов очистки почв и воды от нефтяных загрязнений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Singh M., Desai J. D.* // J. Sci. Ind. Res. 1986. V. 45. P. 413-417.
2. *Bruheim P., Bredholt H., Eimhjellen K.* // Can. J. Microbiol. 1997. V. 43. N 1. P. 17-22.
3. *Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Philp J.C., Christofi N.* // World J. Microbiol. Biotechnol. 1998. V. 17. P. 711-717.
4. *Christofi N., Ivshina I.B.* // J. Appl. Microbiol. 2002. V. 93. N. 6. P. 915-929.
5. *Коронелли Т.В.* // Успехи микробиологии. 1980, Вып.15, С.99-111.
6. *Никовская Г.Н., Гордиенко А.С., Глоба Л.И.* // Микробиология. 1989. Т.58. №3. С.448-451.
7. *Bouchez-Naitali M., Rakatozafy H., Marchal R., Leveau J.Y., Vandecasteele J.P.* // J. Appl. Microbiol. 1999. Vol. 86. P. 421-430.
8. *Gutnick D.L., Minas W.* // Biochem. Soc. Transactions. 1987. V.15. P.22S-35S.
9. *Ron E.Z., Rosenberg E.* // Curr. Opin. Biotechnol. 2002. V. 13. N 3. P. 249-252.
10. *Кучер Р.В., Лесик О.Ю., Єлісєєв С.А., Карпенко О.В., Туровський А.А., Вільданова-Марцишин Р.І., Полулях О.В.* // Доповіді АН УРСР. Сер.Б. Геол., хім. та біол. науки, 1990. №8. С.49-53.
11. *Zhang Y., Miller R.M.* // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V.60. P.2101-2106.
12. *Шульга А.Н., Карпенко Е.В., Єлісєєв С.А., Туровський А.А., Коронелли Т.В.* // Микробиология. 1990. Т.59. N 3. С.443-447.
13. *Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. №5. С.
14. *Карпенко Е.В., Шульга А.Н., Щеглова Н.С., Єлісєєв С.А., Вільданова-Марцишин Р.И.* // Микробиол. Журнал. 1996. Т. 58. № 5. С. 18-24.
15. *Методы общей бактериологии / Ред. Ф. Герхардт.* М.: Мир, 1984. Т.3. 264 с.

16. Определитель бактерий Берги. 9-е изд. / Ред. Г. А. Заварзин. М.: Мир, 1997. Т. 1, 2. 800 с.
17. Hua Z., Chen J., Lun S., Wang X. // Water Res. 2003. V. 37. N 17. P. 4143-4150.
18. Lu X.X., Zhang X., Li G.H., Zhang W.H. // J. Environ. Sci. Health Part A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng. 2003. V. 38. N. 3. P. 483-492.
19. Bodour A.A., Guerrero-Barajas C., Jiorle B.V., Malcomson M.E., Paull A.K., Somogyi A., Trinh L.N., Bates R.B., Maier R.M. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. N. 1. P. 114-120.