

Пирог, Т.П. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти / Т. А. Шевчук, И. Н. Волошина, Н. Н. Гречирчак // Прикладная биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41, № 1. – С. 58-63.

УДК 665.637:631

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА КЕРАМЗИТЕ КЛЕТОК НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ОЧИСТКИ ВОДЫ ОТ НЕФТИ

Т.П. Пирог*, Т.А. Шевчук**, И.Н. Волошина*, Н.Н. Грегирчак*

* Национальный университет пищевых технологий, Киев, 01033.

** Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев, 03143,
e-mail: tapirog@usuft.kiev.ua

Поступила в редакцию 22.04.2004

Из загрязненных нефтью образцов почвы и воды выделены нефтеокисляющие бактерии, идентифицированные как *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, *Nocardia vaceinii* К-8, *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, *Mycobacterium* sp.К-2.

Показано, что применение керамзита в качестве носителя для иммобилизации бактерий позволяет интенсифицировать процесс роста и ассимиляции углеводородных субстратов. Установлена возможность очистки воды, загрязненной нефтью (100 мг/л), иммобилизованными на керамзите клетками *R. erythropolis* ЭК-1 и *N. vaceinii* К-8. Найдена зависимость степени очистки воды от скорости ее подачи, уровня аэрации и наличия биогенных добавок (источников азота и фосфора).

Эффективность очистки воды от нефти иммобилизованными клетками *R. erythropolis* ЭК-1 при высокой скорости протока воды (до 0.68 л/ч), низкой аэрации (до 0.1 л/л в мин) и периодической подаче 0.01% диаммонийфосфата составляла 99.5-99.8%.

Один из способов удаления углеводородов из сточных вод – применение микроорганизмов, способных использовать нефть и нефтепродукты в качестве источника углерода и энергии. Литература по использованию нефтеокисляющих микроорганизмов в биологической очистке промышленных сточных вод обширна и отражена во многих работах [1-5]. Анализ известных данных показывает, что среди методов биологической очистки загрязненных нефтью вод, предпочтение отдается микробным ассоциациям (биоценозы) либо специализированным, адаптированным к определенному составу химических загрязнений, культурам микроорганизмов. Известно, что эффективность очистки воды от нефти и нефтепродуктов повышается при иммобилизации микроорганизмов.

Однако, несмотря на многочисленные исследования по микробиологической очистке вод, загрязненных нефтью, на сегодняшний день остается актуальным и требует решения ряда проблем, в частности эффективная очистка воды с уровнем загрязнения нефтью 100 мг/л при высокой скорости протока воды через иммобилизованные клетки микроорганизмов.

Цель работы – выделение из образцов почвы и воды, загрязненных нефтью, нефтеокисляющих микроорганизмов и их идентификация; исследование способности свободных и иммобилизованных клеток микроорганизмов ассимилировать различные углеводородные субстраты; определение степени очистки загрязненной нефтью воды иммобилизованными клетками микроорганизмов на модельной лабораторной установке.

МЕТОДИКА

Получение накопительных культур нефтеокисляющих микроорганизмов. Выделение нефтеокисляющих микроорганизмов осуществляли из образцов почвы и воды, отобранных на территории Надворнянского нефтеперерабатывающего завода (Украина). Накопительные культуры, использующие в качестве источника углерода различные углеводороды, получали при внесении 0.5 г почвы или 1 мл воды 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 – 1.0; NaCl – 1.0; Na_2CO_3 – 0.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.02; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.01; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.01. В качестве источника углеродного питания использовали легкую нефть (плотность 0.85 г/см^3) – 0.012 – 0.12% (об. %); жидкие парафины (н-алканы) и гексадекан по 0.5 об. %. Культивирование осуществляли при $30 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 7.0, в течение 5 сут. 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 [6], идентификацию микроорганизмов проводили по [7].

Выращивание чистых культур. Культивирование выделенных чистых культур осуществляли на минеральной среде вышеуказанного состава и среде Кодама [8], содержащей в качестве источника углеродного питания легкую нефть (плотность 0.85 г/см^3) – 0.06 – 0.12; жидкие парафины (н-алканы) – 0.5; этанол – 1 об. % соответственно. Микроорганизмы выращивали в колбах со 100 мл среды на качалке (220 об/мин) при $30 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 16 – 96 ч. В качестве посевного материала использовали 1-суточные культуры, выращенные на МПА, а также культуры из экспоненциальной фазы роста, выращенные на минеральной среде Кодама с 0.5 об. % этанола.

Осуществляли гетерофазное культивирование некоторых штаммов бактерий на минеральной среде с нефтью и этанолом в присутствии керамзита. Керамзит предварительно измельчали до частиц размером 2 – 3 мм, вносили по 5 г в колбы объемом 750 мл и стерилизовали при $121 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 1 ч.

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

или весовым методом. Удельную скорость роста микроорганизмов рассчитывали, как описано в работе [9].

Содержание углеводов в культуральной жидкости определяли весовым методом. Для этого осуществляли трехкратную экстракцию углеводов гексаном, экстракт упаривали на роторном испарителе (40 °С) до постоянной массы.

Расчет производительности модельной установки для очистки воды от нефти. Схема лабораторной установки для очистки загрязненных нефтью вод представлена на рис. 1. Расчет производительности колонки осуществляли, исходя из размеров промышленной установки по очистке воды на одном из нефтеперерабатывающих предприятий.

Данная промышленная установка была выбрана для расчета производительности лабораторной в связи с высокой скоростью протока очищаемой воды и низкой эффективностью ее очистки от нефтепродуктов.

Объем слоя керамзита составляет:

$$V = S \cdot H = (\pi d^2 / 4) \cdot H, \quad (1)$$

где V – объем, м^3 ; S – площадь, м^2 , H – высота слоя керамзита, м ($H = 1$ м); d – диаметр аппарата, м ($d = 10$ м). $V = (3.14 \cdot 10^2 / 4) \cdot 1 = 78.5 \text{ м}^3$

Производительность (объемный расход жидкости):

$$Q = S \cdot v = (\pi d^2 / 4) \cdot v, \quad (2)$$

где Q – производительность, $\text{м}^3/\text{ч}$; v – скорость прохождения воды, $\text{м}/\text{ч}$ ($v = 4$ $\text{м}/\text{ч}$). $Q = (3.14 \cdot 10^2 / 4) \cdot 4 = 314 \text{ м}^3/\text{ч}$.

Проток (скорость разбавления):

$$D = Q/V, \quad (3)$$

где D – скорость разбавления, ч^{-1} , $D = 314/78.5 = 4 \text{ ч}^{-1}$.

В модельной установке использовали стеклянную колонку размером 3.5×22 см, высота керамзитового слоя – 18 см. Следовательно, объем керамзитового слоя в лабораторной колонке составил $V = (3.14 \cdot 0.035^2 / 4) \cdot 0.18 = 0.00017 \text{ м}^3$. Таким образом, производительность лабораторной колонки $Q = V \cdot D = 0.00017 \cdot 4 \cdot 1000 = 0.68 \text{ л}/\text{ч}$.

Иммобилизацию клеток в модельной установке осуществляли на измельченном керамзите (размер частиц 2-3 мм). Колонку заполняли керамзитом, промывали водопроводной водой и стерилизовали при 121 °С в течение 1 ч. Дальнейшую работу по использованию иммобилизованных на керамзите нефтеокисляющих бактерий для очистки воды на лабораторной модельной установке проводили в нестерильных условиях при комнатной температуре (18-20°C).

Перед иммобилизацией клеток керамзитный слой насыщали нефтью. Для этого использовали легкую нефть (плотность 0.85 г/см³). Через колонку в течение 24 ч в условиях аэрации пропускали воду, содержащую 100 – 500 мг/л нефти. Каждые 4 ч отбирали пробы воды (объемом 200 мл) на входе и выходе из колонки и анализировали содержание нефти весовым методом. Насыщение керамзитового слоя нефтью проводили до установления одинакового количества нефти в подаваемой и выходящей воде.

Для иммобилизации клеток *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на насыщенном нефтью керамзите использовали культуру, выращенную до конца экспоненциальной фазы на среде Кодама 1 об. % этанола, а для иммобилизации клеток *Nocardia vaseinii* К-8 – на среде Кодама с 0.5 об. % парафинов. Клеточную суспензию с оптической плотностью 0.15×10 подавали в колонку при помощи перистальтического насоса НП-1М (НПО точного микробиологического машиностроения, Россия) со скоростью 0.1 ч⁻¹ с рециркуляцией. Иммобилизацию осуществляли в течение 24 ч в аэрируемых условиях (при скорости подачи воздуха в колонку 0.05 л/л мин). Через 24 ч клеточную суспензию сливали и измеряли ее оптическую плотность. Степень иммобилизации клеток определяли как отношение разности оптической плотности суспензии на входе и выходе из колонки к оптической плотности на входе и выражали в процентах.

Очистка на модельной установке воды, загрязненной нефтью. После иммобилизации клеток через колонку в условиях аэрации пропускали водопроводную воду, содержащую 100 – 250 мг/л легкой нефти (плотность 0.85 г/см³) Периодически в воду с нефтью вносили 0.01-0.1% диаммонийфосфата -

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Исследовали степень очистки воды при производительности колонки, равной 0.3; 0.5 и 0.68 л/ч. Расход воздуха поддерживали на уровне 0.05 и 0.10 л/л воды в мин (микрокомпрессор АЭИ-3, НПО «Реле и автоматики», Украина). Каждые 6 – 8 ч отбирали пробы воды (по 200 мл) на входе и выходе из колонки и определяли содержание нефти весовым методом, а также методом инфракрасной (ИК) спектроскопии на анализаторе нефтепродуктов АН-1 (Россия). Продолжительность непрерывной работы колонки составляла 30 дней.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификацию и выделение нефтеокисляющих микроорганизмов. Из 12 образцов почвы и воды, загрязненных нефтью, было отобрано 10 накопительных культур, которые в течение 3 сут культивирования полностью ассимилировали все углеводородные субстраты. Последующие эксперименты показали, что накопительные культуры состоят из 3-4 типов бактерий. Исследование способности роста выделенных монокультур на средах с нефтью, парафинами и гексадеканом показало, что большинство из них менее активно используют эти субстраты по сравнению с ассоциациями, из которых монокультуры были выделены.

Отобрано 4 штамма бактерий, которые на основе морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств были идентифицированы как *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, *Nocardia vaceinii* К-8, *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, *Mycobacterium* sp. К-2. Показатели культивирования данных бактериальных штаммов на различных субстратах представлены в табл. 1.

Все исследуемые штаммы способны расти на углеводородных субстратах, однако эффективность потребления жидких парафинов была существенно выше, чем нефти (75-100% против 40-70% соответственно). Причем *A. calcoaceticus* К-4 и *R. erythropolis* ЭК-1 характеризовались высокой скоростью роста и высоким уровнем биомассы при культивировании на этанолсодержащей среде. Следует отметить, что только при выращивании всех штаммов на этаноле наблюдали образование гомогенной клеточной суспензии, что является важным и

существенным фактором для иммобилизации клеток. При использовании в качестве источника углерода парафинов часто образовывались конгломераты клеток, а также наблюдалась частичная или полная их флотация.

Культивирование *A. calcoaceticus* К-4 на среде с нефтью сопровождалось коалесценцией нефти: при концентрации нефти 0.06 об. % образовывались шарики диаметром 3 – 4 мм, а при 0.12 об. % нефти – диски диаметром до 7 – 8 мм и толщиной 1 – 2 мм. Способность нефти к коалесценции может быть обусловлена синтезом внеклеточных метаболитов, обладающих поверхностно-активными свойствами. Именно это свойство нефти может иметь огромное значение при использовании штамма бактерий (или его метаболитов) для очистки трубопроводов, танкеров, барж, различных емкостей от нефти и нефтепродуктов.

Эксперименты показали, что при выращивании 3 остальных штаммов на среде с нефтью до 30% внесенной нефти адсорбируется на стекле колб (экстракция углеводородов со стенок колб после удаления культуральной жидкости).

В табл. 1 представлены данные культивирования исследуемых штаммов при использовании инокулята с МПА. В случае применения посевного материала, выращенного на этанолсодержащей минеральной среде, способность штаммов окислять нефть практически не изменялась.

Исследование способности свободных и иммобилизованных клеток микроорганизмов ассимилировать различные углеводородные субстраты. Было установлено, что штаммы *A. calcoaceticus* К-4, *N. vaseinii* К-8 и *R. erythropolis* ЭК-1 способны расти и размножаться в присутствии керамзита (табл. 2). При этом наблюдали как увеличение максимальной удельной скорости роста бактерий, так и (в некоторых случаях) повышение уровня биомассы. После выращивания бактерий в присутствии керамзита количество остаточной нефти в культуральной жидкости составляло 20 – 35% (без керамзита – 40 – 55%); при этом уровень биомассы практически не изменялся. Установлено, что снижение содержания нефти в вариантах с керамзитом обусловлено адсорбцией на нем нефти.

Для дальнейшей работы по очистке загрязненной нефтью воды иммобилизованными на керамзите клетками бактерий были выбраны штаммы *R. erythropolis* ЭК-1 и *N. vaceinii* К-8, обладающие более высокой скоростью роста на парафинах, (табл. 1) и высокой степенью иммобилизации клеток на керамзите (75 – 85%).

При культивировании *R. erythropolis* ЭК-1 и *N. vaceinii* К-8 на среде с нефтью в присутствии керамзита наблюдали адсорбцию нефти на носителе (до 20%), поэтому перед иммобилизацией клеток в модельной установке насыщали керамзит нефтью. Известно, что родококки и нокардии характеризуются наличием в составе клеточной стенки миколовых кислот, что обуславливает гидрофобность клеток [7]. По нашему мнению, это свойство должно обеспечивать более эффективную иммобилизацию таких клеток на насыщенном нефтью керамзите.

После иммобилизации клеток в колонку с различной скоростью подавали воду, содержащую 100 мг/л нефти (рис. 2). Как видно из представленных на рис. 2 данных, независимо от производительности колонки к 24 – 36 ч наблюдали постепенное повышение содержания нефти в выходящей воде до 30 – 50 мг/л. Следует отметить, что по мере увеличения производительности колонки остаточное содержание нефти в воде повышалось (от 30 мг/л для 0.3 л/ч до 50 мг/л для 0.68 л/ч).

Определение степени очистки загрязненной нефтью воды иммобилизованными клетками микроорганизмов на модельной лабораторной установке. Известно, что применение бактериальных культур для очистки от нефтяных загрязнений часто оказывается эффективным лишь при добавлении минеральных источников питания. Так, ускорение процесса биodeградации нефти в ответ на внесение в места загрязнения ею азота, фосфора и калия отмечала еще Изъюрова [10]. Присутствие азота и фосфора является необходимым условием биodeградации нефти при очистке танкеров с использованием бактерий *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 [11]. В ряде экспериментов было установлено, что добавление в среду какой-либо соли

(Na_2HPO_4 , NH_4NO_3 или KNO_3) даже в наиболее высокой концентрации лишь незначительно повышало деградацию нефти [12]. Однако дополнительное внесение фосфатов сопровождалось значительным увеличением потребления нефти.

Наши эксперименты показали, что добавление в загрязненную нефтью воду 0.1% диаммонийфосфата приводило к снижению содержания нефти на выходе из колонки (рис. 2). Так, для штамма *R. erythropolis* ЭК-1 содержание нефти снизилось до 3 – 4 мг/л к 72 – 96 ч. В случае использования штамма *N. vaseinii* К-8 аналогичное количество нефти в выходящей воде было отмечено лишь для низкой производительности колонки (0.3 л/ч). При более высокой скорости прохождения воды через колонку содержание остаточной нефти в ней составляло 15 – 20 мг/л. На рис. 2 представлены данные определения концентрации нефти весовым методом. Следует отметить, что по результатам ИК-спектроскопии содержание нефти в выходящей воде к 72 – 96 ч было на один-два порядка ниже по сравнению с данными весового метода и составляло не более 0.05-0.10 мг/л для штамма *R. erythropolis* ЭК-1 (независимо от производительности колонки).

Снижение содержания нефти на выходе из колонки после внесения 0.1% диаммонийфосфата сопровождалось увеличением мутности воды. Микробиологический анализ показал наличие в воде клеток исследуемых бактерий. Таким образом, в присутствии 0.1% диаммонийфосфата происходило размножение бактериальных клеток и высвобождение их с носителя. В связи с этим в дальнейших экспериментах концентрацию биогенной добавки снизили до 0.01%. В таких условиях наблюдали эффективную устойчивую работу модельной установки в течение 7 сут.: при производительности колонки 0.68 л/ч содержание нефти в выходящей воде составляло 2 – 3 мг/л для штамма *R. erythropolis* ЭК-1 и около 12 – 16 мг/л для штамма *N. vaseinii* К-8 (данные весового метода). Содержание нефти, определяемое методом ИК-спектроскопии, составляло 0.05 – 0.09 и 0.2 – 0.4 мг/л для *R. erythropolis* ЭК-1 и *N. vaseinii* К-8 соответственно. При этом в воде отсутствовали клетки данных бактерий. Однако на 8 сут опять наблюдали помутнение воды на выходе из колонки, обусловленное

размножением клеток. Дальнейшие эксперименты показали, что диаммонийфосфат в концентрации 0.01% следует вносить в загрязненную нефтью воду периодически: в течение 6 – 7 сут с последующим перерывом на 1 – 2 сут и т.д.

Увеличение аэрации до 0.1 л/л воды в мин сопровождалось повышением эффективности очистки воды для обоих исследуемых бактериальных штаммов (рис. 3). Однако и в условиях повышенной аэрации остаточное содержание нефти в воде при использовании штамма *N. vacemii* К-8 было в 2.5 – 3.5 раза выше, чем для штамма *R. erythropolis* ЭК-1.

При увеличении начального содержания нефти в воде со 100 до 250 мг/л (производительность колонки 0.68 л/ч; аэрация 0.1 л/л воды в мин) эффективность очистки иммобилизованными клетками штамма *N. vacemii* К-8 снижалась и составляла не более 90%, в то время как для штамма *R. erythropolis* ЭК-1 практически не изменялась и оставалась на уровне 99.0 – 99.5%.

Такую высокую эффективность очистки воды от нефти иммобилизованными клетками *R. erythropolis* ЭК-1 наблюдали в течение 30 дней непрерывной работы модельной лабораторной установки в нестерильных условиях.

Согласно правилам приема сточных вод предприятий в системы канализации и водоемы Украины от 6.07.1993 г допускается содержание нефтепродуктов в промышленных сточных водах 4.4 мг/л при сбросе в городскую канализацию и 0.3 мг/л при сбросе в водоемы.

Таким образом, в результате проведенной работы из образцов почвы и воды, загрязненных нефтью, выделены и идентифицированы бактериальные культуры, способные ассимилировать нефть в концентрациях, близких к ее содержанию в сточных водах, и обладающие способностью к коалесценции нефти в системе “нефть в воде”. Установлена возможность роста и размножения клеток исследуемых бактериальных культур в присутствии керамзита, степень иммобилизации клеток на этом носителе составляет 75 – 85%. В модельных условиях показана возможность очистки воды, содержащей 100 – 250 мг/л нефти, иммобилизованными на керамзите клетками бактерий при высокой скорости

подачи воды (до 0.68 л/мин) и в условиях низкой аэрации (до 0.1 л воздуха/л воды в мин). Степень очистки воды от нефти повышалась в присутствии биогенных добавок: при периодическом добавлении 0.01% диаммонийфосфата эффективность очистки составляла 99.5 – 99.8%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Биттеева М.Б., Мурзаков Б.Г., Морцакова Г.Н., Хамроев О.Ж., Капотина Л.Н., Фадеева Т.Н., Помазкова В.А., Левандовская Ю.Б., Демидова Е.И., Поспелов М.Е.* Патент РФ. 1994. №2014286.
2. *Кожанова Г.А.* Патент РФ. 1995. №2031860.
3. *Мурзаков Б.Г., Морцакова Г.Н., Капоткина Л.Н.* Патент РФ. 1996. №2053204.
4. *Огурцова Л.В., Морозова Т.Н., Жданова Е.В.* Патент РФ. 1999. №2129604.
5. *Ягафарова Г.Г., Сафаров А.Х., Ильина Е.Г., Ягафаров И.Р., Барахнина В.Б., Сухаревич М.Э.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т.38. №5. С. 518 – 522.
6. *Методы общей бактериологии / Ред. Ф. Герхардт.* М.: Мир, 1984. Т.3. 264 с.
7. *Определитель бактерий Берги. 9-е изд. / Ред. Г. А. Заварзин.* М.: Мир, 1997. Т. 1, 2. 800 с.
8. *Кодама Т., Накахара Т., Омори Т., Бинх Н.Т., Хашино К., Минода И.* // Рост микроорганизмов на C₁-соединениях. Тез. докл. симп. Пушкино: НЦБИ АН СССР, 1977. С. 213-215.
9. *Перт С.Дж.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М: Мир, 1978. 331 с. 2
10. *Изъюрова А.И.* // Гигиена и санитария. 1956. Т. 6. № 5. С. 15.
11. *Gutnick D.L., Wise G.S.* // Biopolymers. 1987. V. 26. P. 223-240.
12. *Atlas R., Bartha R.* // Biotechnol. and Bioeng. 1972. V. 14. № 3. P. 309.