

DESTRUCTION OF COMPLEX OIL POLLUTIONS WITH HEAVY METALS IN THE PRESENCE OF *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 SURFACTANTS

T. Pirog, N. Antoniuk, K. Panasiuk, S. Antoniuk
National University of Food Technologies

Key words:

Nocardia vaccinii
Biosurfactants
Complex oil pollution
with heavy metals
Destruction of oil

Article history:

Received 15.02.2015
Received in revised form
16.03.2015
Accepted 24.04.2015

Corresponding author:

T. Pirog
E-mail:
tapirog@nuft.edu.ua

ABSTRACT

The possibility of using *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 surfactants in the form of culture liquid for destruction of complex oil pollutions with heavy metals was studied. It was shown that the degree of oil degradation in water (3–6 g/l) containing the mixture of copper, cadmium and lead cations (0.1–1.0 mM) after treatment with culture liquid of the IMB B-7405 strain (10 % v/v) at 25 days was 80–90 %. Intensification of oil decomposition in the presence of surfactants is determined by activation of natural oil-oxidizing microbiota, concentration of which was increased to the end of experiment in 100-fold.

ДЕСТРУКЦІЯ КОМПЛЕКСНИХ З ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ НАФТОВИХ ЗАБРУДНЕНЬ ЗА НАЯВНОСТІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405

Т.П. Пирог, Н.О. Антонюк, К.В. Панасюк, С.І. Антонюк
Національний університет харчових технологій

У статті досліджено можливість використання поверхнево-активних речовин (ПАР) *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 у вигляді культуральної рідини для деструкції комплексних з важкими металами нафтових забруднень. Встановлено, що після обробки культуральною рідиною штаму IMB B-7405 (об'ємна частка —10 %) ступінь деструкції нафти у воді (3–6 г/л) за наявності суміші катіонів міді, кадмію і свинцю (0,1–1,0 мМ) на 25 добу становив 80–90 %. Інтенсифікація розкладання нафти за наявності поверхнево-активних речовин зумовлена активацією природної нафтоокиснювальної мікробіоти, що засвідчило збільшення її чисельності до кінця експерименту на 2–3 порядки.

Ключові слова: *Nocardia vaccinii*, поверхнево-активні речовини, комплексні з важкими металами нафтові забруднення, розкладання нафти.

Постановка проблеми. Нині все частіше спостерігаються порушення екологічної рівноваги природного середовища, спричинені розливом нафти у місцях її видобутку, збереження, переробки, транспортування, використання. У разі аварійних викидів нафти гине флора і фауна, стають непридатними для використання забруднені ґрунти, джерела питної води, рибогосподарські водоймища [1]. Самоочищення екосистем відбувається дуже повільно, а використання механічних методів для ліквідації нафтових забруднень доволі часто є малоефективним і потребує значних затрат людських ресурсів і залучення спеціальної техніки. Особливе місце займають біологічні способи очищення, які, починаючи з 70-х років ХХ ст., вважаються багатьма розвинутими країнами пріоритетними завдяки високій ефективності, екологічній безпечності та економічній вигоді [1, 2].

На сьогодні для очищення води та ґрунту від нафтових забруднень переважно використовуються біопрепарати, що являють собою ліофілізовану біомасу (або пасту) нафтоокиснюючих бактерій [3]. У той же час в літературі наявна інформація про використання поверхнево-активних речовин (ПАР) в природоохоронних технологіях, зокрема для видалення нафти з екосистем [4].

Відомо кілька механізмів деструкції нафти під дією ПАР, один з яких пов'язаний з десорбцією, мобілізацією або солюбілізацією органічних забрудників і, як наслідок, з підвищенням їх біодоступності для мікроорганізмів, а інший — з підвищенням гідрофобності поверхні клітин самих деструкторів [5, 6]. Так, згідно з першим механізмом, вилучення гідрофобних ксенобіотиків з ґрунту може відбуватися двома шляхами залежно від концентрації ПАР. За концентрації ПАР, нижчої за критичну концентрацію міцелоутворення (ККМ), спостерігається явище мобілізації, в результаті чого знижуються міжфазні та капілярні сили, що утримують нафту в ґрунті, та збільшується кут контакту ПАР з системою нафта/ґрунт [5]. За концентрації ПАР на рівні ККМ і вище відбувається процес солюбілізації, тобто нафта укладається в міцели, які гідрофобними кінцями розміщені всередину, а гідрофільними — назовні, що забезпечує розчинність гідрофобного забрудника [6].

Відомо, що за наявності важких металів ефективність деструкції нафти може знижуватися, тому важливим завданням сьогодення є пошук методів очищення довкілля від таких комплексних забруднень [7]. Одним із способів зниження токсичного впливу металів на клітини-деструктори є їх зв'язування карбонатом кальцію, фосфатами, хелатуючими агентами, глинистими мінералами, а також поверхнево-активними речовинами [4].

У попередніх дослідженнях із забрудненого нафтою ґрунту виділено штам нафтоокиснювальних бактерій, ідентифікований як *Nocardia vaccinii* K-8, та показано можливість використання іммобілізованих на керамзиті клітин для очищення води від нафти (100 мг/л) [8]. У подальших дослідженнях було встановлено здатність *N. vaccinii* ІМВ В-7405 до синтезу поверхнево-активних речовин.

Мета статті. Дослідження впливу ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на деструкцію нафти у воді за наявності катіонів важких металів.

Матеріали і методи. Штам *N. vaccinii* K-8, ізольований із забрудненого нафтою ґрунту, депонований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за номером ІМВ В-7405. *N. va-*

сцині IMB В-7405 вирощували на синтетичному поживному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 — 0,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1, KH_2PO_4 — 0,1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001, дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка). Джерело вуглецю та енергії — гліцерин у концентрації 1,5 % (об'ємна частка).

Як інокулянт використовували культуру в експоненційній фазі росту, вирощену на середовищі наведеного вище складу, що містило 0,5 % (об'ємна частка) гліцерину. Кількість посівного матеріалу (10^4 — 10^5 КУО/мл) становила 5—10 % від об'єму поживного середовища. Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 28—30 °С упродовж 120 год. Як препарат ПАР використовували постферментаційну культуральну рідину.

Для моделювання забруднених нафтою і металами водою у пластикову емність вносили 2 л бюветної води, на поверхню якої наносили 6—15 мл нафти, після чого додавали препарати ПАР у концентрації 10 % (об'ємна частка), а також 0,1—1,0 Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} окремо і в різних комбінаціях у вигляді 1М розчинів солей $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ і $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COOH})_4$ відповідно. Як джерело біогенних елементів використовували діамонійфосфат (0,01 %). Загальну кількість живих клітин у бюветній воді упродовж експерименту (до 25 діб) визначали методом Коха на МПА. У процесі дослідження використовували нафту з родовища Долина Івано-Франківської обл. (Україна) густиною 0,85 г/см³.

Кількість нафти визначали ваговим методом. Для цього здійснювали трикратну екстракцію нафти гексаном (співвідношення 1:1). Органічний екстракт упарювали до постійної маси на роторному випарнику IP-1M2 (Росія) при температурі 55 °С і абсолютному тиску 0,4 атм.

Усі досліди проводили в трьох повторях, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3—5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали за Лакінім. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значимості $p < 0,05$.

Результати і обговорення. У табл. 1 наведено дані щодо деструкції нафти у воді за наявності різних концентрацій катіонів кадмію, свинцю і міді. Експерименти показали, що у воді без катіонів металів ступінь розкладання нафти під дією ПАР-вмісної культуральної рідини штаму IMB В-7405 на 25 добу становив 76—82 %. За підвищення концентрації нафти з 3 до 6 г/л у воді ефективність деструкції нафти дещо знижувалася. У разі внесення у забруднену нафтою воду Cd^{2+} і Pb^{2+} (0,1—0,5 мМ) ступінь деградації нафти знижувався у середньому на 5—10 % порівняно з таким у воді без катіонів металів. Проте за наявності Cu^{2+} (0,5—1,0 мМ) у воді, що містила нафту, а також катіони або кадмію, або свинцю, спостерігали інтенсифікацію розкладання нафти, причому в деяких варіантах ступінь деструкції нафти був вищим, ніж у воді без катіонів металів. За внесення у нафтовмісну воду катіонів усіх трьох металів у концентрації 0,1—0,5 мМ ступінь деструкції нафти залишався досить високим (на рівні 82—86 %) незалежно від концентрації нафти у воді. І тільки у разі підвищення концентрації катіонів міді до 1,0 мМ, а кадмію і свинцю до 0,5 мМ у воді ефективність розкладання нафти знижувалася до 74—78 %.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

Таблиця 1. Вплив культуральної рідини *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на деструкцію нафти у воді за наявності Cu^{2+} , Cd^{2+} і Pb^{2+}

Концентрація катіонів у воді, мМ			Ступінь деструкції нафти на 25 добу (%) за початкової концентрації (г/л)	
Cu^{2+}	Cd^{2+}	Pb^{2+}	3,0	6,0
0	0	0	82	76
0	0,1	0,1	77	71
0	0,1	0,5	70	69
0	0,5	0,1	72	70
0	0,5	0,5	69	66
0,5	0	0,1	88	80
0,5	0	0,5	87	78
1,0	0	0,1	84	78
1,0	0	0,5	83	78
0,5	0,1	0	91	79
0,5	0,5	0	86	79
1,0	0,1	0	83	80
1,0	0,5	0	84	80
0,5	0,1	0,1	85	86
0,5	0,5	0,1	83	84
0,5	0,1	0,5	84	85
0,5	0,5	0,5	82	82
1,0	0,1	0,1	82	80
1,0	0,5	0,1	76	76
1,0	0,1	0,5	76	78
1,0	0,5	0,5	74	74

Примітка. Під час визначення ступеня деструкції нафти похибка не перевищувала 5 %. Ступінь деструкції нафти в контрольному (необробленому ПАР) варіанті 3,5 %.

Наведені у табл. 1 дані свідчать про стимуляцію розкладання комплексних з важкими металами нафтових забруднень у воді катіонами міді. Раніше [9, 10] такі самі закономірності були встановлені нами під час вивчення впливу ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 і *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 на деструкцію нафти у воді та ґрунті. У [9, 10] ми висловили припущення про те, що інтенсифікація розкладання нафти за наявності катіонів міді може бути зумовлена їх стимулювальним впливом на активність алкангідроксилаз (перших ферментів катаболізму вуглеводнів) як штамів-продуцентів ПАР, так і природної (автохтонної) нафтоокиснювальної мікробіоти. На користь цього припущення свідчили літературні дані про метагеномний аналіз забруднених нафтою ґрунтів і водойм, який показав, що після забруднення нафтою у цих екосистемах спостерігається індукція *AlkB* генів, відповідальних за синтез алкангідроксилаз [11]. Дані літератури [12] і наші власні результати [13] свідчать про те, що активаторами алкангідроксилаз є катіони міді.

У табл. 2 наведено дані про зміну загальної чисельності мікробіоти у воді на 25 добу після внесення ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405. Чисельність мікробіоти у воді після обробки культуральною рідиною штаму ІМВ В-7405 до кінця експерименту збільшилася на 2 порядки. У разі внесення катіонів кадмію і свинцю у забруднену нафтою воду кількість клітин на 25 добу була

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

у 2—3 рази нижчою порівняно з такою у воді без катіонів важких металів. У той же час за наявності у воді катіонів міді спостерігали збільшення чисельності клітин ще на два порядки: до $(2—9) \cdot 10^7$ КУО/мл (табл. 2). Такі дані підтверджують наше припущення про роль поверхнево-активних речовин в активації нафтоокиснювальної мікробіоти в результаті солюбілізації нафти і стимуляції алкангідроксилази автохтонної мікробіоти катіонами міді.

Слід зазначити, що показники деструкції нафти у воді, забрудненій катіонами міді, кадмію та свинцю, після обробки препаратами ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405, встановлені у даному дослідженні (80—90 %), є дещо нижчими, ніж визначені нами раніше для поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB B-7241 і *R. erythropolis* IMB Ac-5017 (80—95 %) [9, 10]. Така різниця може бути зумовлена тим, що досліджували вищі концентрації катіонів металів (0,1—1,0 мМ), тоді як у попередніх дослідженнях — 0,01—0,5 мМ.

Таблиця 2. Мікробіологічний контроль забрудненої нафтою і важкими металами води після обробки культуральною рідиною *N. vaccinii* IMB B-7405

Концентрація катіонів у воді, мМ			Загальна кількість клітин (КУО/мл) у воді з початковою концентрації нафти (г/л)	
Cu ²⁺	Cd ²⁺	Pb ²⁺	3,0	6,0
0	0	0	$5,8 \cdot 10^5$	$5,91 \cdot 0^5$
0	0,1	0,1	$3,9 \cdot 10^5$	$2,9 \cdot 10^5$
0	0,1	0,5	$3,8 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^5$
0	0,5	0,1	$2,3 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^5$
0	0,5	0,5	$1,8 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^5$
0,5	0	0,1	$7,3 \cdot 10^7$	$7,1 \cdot 10^7$
0,5	0	0,5	$6,81 \cdot 0^7$	$6,51 \cdot 0^7$
1,0	0	0,1	$6,31 \cdot 0^7$	$6,91 \cdot 0^7$
1,0	0	0,5	$5,91 \cdot 0^7$	$7,1 \cdot 10^7$
0,5	0,1	0	$5,6 \cdot 10^7$	$7,1 \cdot 10^7$
0,5	0,5	0	$4,8 \cdot 10^7$	$8,1 \cdot 10^7$
1,0	0,1	0	$5,1 \cdot 10^7$	$6,8 \cdot 10^7$
1,0	0,5	0	$4,9 \cdot 10^7$	$7,4 \cdot 10^7$
0,5	0,1	0,1	$1,8 \cdot 10^8$	$2,9 \cdot 10^7$
0,5	0,5	0,1	$7,6 \cdot 10^7$	$4,9 \cdot 10^7$
0,5	0,1	0,5	$3,4 \cdot 10^8$	$3,3 \cdot 10^7$
0,5	0,5	0,5	$7,2 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^7$
1,0	0,1	0,1	$7,4 \cdot 10^7$	$5,3 \cdot 10^7$
1,0	0,5	0,1	$9,1 \cdot 10^7$	$6,11 \cdot 0^7$
1,0	0,1	0,5	$8,7 \cdot 10^7$	$5,1 \cdot 10^7$
1,0	0,5	0,5	$9,1 \cdot 10^7$	$4,11 \cdot 0^7$

Примітка. Початкова чисельність клітин у воді становила $2,4—3,2 \cdot 10^4$ КУО/мл. Під час визначення концентрації клітин похибка не перевищувала 5 %.

Висновки

Отже, у результаті проведеного дослідження встановлено можливість використання поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* IMB B-7405 у вигляді культуральної рідини для деструкції (до 90 %) комплексних з важкими металами (Cu²⁺, Cd²⁺ і Pb²⁺, 0,1—1,0 мМ) нафтових забруднень у воді (3—6 г/л).

Література

1. *The bacterial community structure of hydrocarbon-polluted marine environments as the basis for the definition of an ecological index of hydrocarbon exposure* / M. Lozada, M.S. Marcos, M.G. Commendatore [et al.] // *Microbes and Environments*. — 2014. — Vol. 29, № 3. — P. 269—276.
2. *Das N. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview* / N. Das and P. Chandran // *Biotechnology Research International*. — 2011. — doi: 10.4061/2011/941810.
3. *Сравнительная характеристика отечественных биопрепаратов, предлагаемых для очистки почв и грунтов от загрязнения нефтью и нефтепродуктами* / Е.А. Рогозина, О.А. Андреева, С.И. Жаркова [и др.] // *Нефтегазовая геология. Теория и практика*. — 2010. — Т. 5, № 3. — http://www.ngtp.ru/rub/7/37_2010.pdf.
4. *Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review* / X. Mao, R. Jiang, W. Xiao [et al.] // *Journal of Hazardous Materials*. — 2014. — V. 285. — P. 419—435. doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.12.009.
5. *Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil* / C.C. Lai, Y.C. Huang, Y.H. Wei [et al.] // *Journal of Hazardous Materials*. — 2009. — Vol. 167, # 1—3. — P. 609—614.
6. *Application of rhamnolipid and surfactin for enhanced diesel biodegradation — effects of pH and ammonium addition* / L.M. Whang, P.W. Liu, C.C. Ma [et al.] // *Journal of Hazardous Materials*. — 2009. — V. 164, # 2—3. — P. 1045—1050.
7. *Olaniran A.O. Bioavailability of heavy metals in soil: impact on microbial biodegradation of organic compounds and possible improvement strategies* / A.O. Olaniran, A. Balgobind, B. Pillay // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2013. — V. 14, # 5. — P. 10197—10228.
8. *Использование мобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти* / Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, И.Н. Волошина [и др.] // *Прикладная биохимия и микробиология*. — 2005. — Т. 41, № 1. — С. 58—63.
9. *Biosurfactants of Rhodococcus erythropolis IMV Ac-5017: Synthesis intensification and practical application* / Т. Pirog, A. Sofilkanych, T. Shevchuk [et al.] // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. — 2013. — V. 170, # 4. — P. 880—894. doi: 10.1007/s12010-013-0246-7.
10. *Пирог Т.П. Роль поверхнево-активних речовин Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241 у деструкції комплексних з важкими металами нафтових забруднень* / Т.П. Пирог, А.Д. Конон, С.А. Парфенюк // *Наукові праці Національного університету харчових технологій*. — 2014. — Т. 20, № 2. — С. 8—14.
11. *The use of a combination of alkB primers to better characterize the distribution of alkane-degrading bacteria* / D. Jurelevicius, V.M. Alvarez, R. Peixoto [et al.] // *PLoSOne*. — 2013. — V. 8, # 6. doi: 10.1371/journal.pone.0066565.
12. *Semrau J.D. Methanotrophs and copper* / J.D. Semrau, A.A. DiSpirito, S. Yoon // *FEMS Microbiology Reviews*. — 2010. — V. 34, # 4. — P. 496—531.
13. *Влияние Cu²⁺ на синтез поверхностно-активных веществ Acinetobacter calcoaceticus IMB B 7241 и Rhodococcus erythropolis IMB Ac-5017* / Т.П. Пирог, А.Д. Конон, А.П. Софилканич [и др.] // *Мікробіологічний журнал*. — 2013. — Т. 75, № 1. — С. 3—13.

ДЕСТРУКЦИЯ КОМПЛЕКСНЫХ С ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ В ПРИСУТСТВИИ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ NOCARDIA VACCINII IMB B-7405

Т.П. Пирог, Н.А. Антонюк, Е.В. Панасюк, С.И. Антонюк
 Национальный университет пищевых технологий

В статье исследована возможность использования поверхностно-активных веществ Nocardia vaccinii IMB B-7405 в виде культуральной жидкости для

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

деструкции комплексных с тяжелыми металлами нефтяных загрязнений. Установлено, что степень деструкции нефти в воде (3—6 г/л), содержащей смесь катионов меди, кадмия и свинца (0,1—1,0 мМ), после обработки культуральной жидкостью штамма *IMB B-7405* (10 % по объему) на 25 суток составляла 80—90 %. Интенсификация разложения нефти в присутствии поверхностно-активных веществ обусловлена активацией природной нефтеокисляющей микробиоты, о чем свидетельствовало увеличение ее численности к концу эксперимента на 2—3 порядка.

Ключевые слова: *Nocardia vacsinii*, поверхностно-активные вещества, комплексные с тяжелыми металлами нефтяные загрязнения, разложение нефти.