

УДК 579.66

UDC 579.66

**ЭКОНОМИЧЕСКИ ЭФФЕКТИВНОЕ
ПОЛУЧЕНИЕ АДАПТИРОВАННОЙ К
СУБСТРАТУ БИОМАССЫ
НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ
АКТИНОБАКТЕРИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В
ПРОЦЕССАХ БИОРЕМЕДИАЦИИ**

**ECONOMIC EFFICIENT PRODUCTION OF
BIOMASS ADAPTED TO THE SUBSTRATE OF
OIL OXIDIZING ACTINOBACILLOSIS USED
IN BIOREMEDIATION PROCESSES**

Худокормов Александр Александрович
к.б.н.

Khudokormov Alexander Alexandrovich
Cand.Biol.Sci.

Самков Андрей Александрович
к.б.н.

Samkov Andrey Alexandrovich
Cand.Biol.Sci.

Волченко Никита Николаевич
к.б.н., ст. преподаватель

Volchenko Nikita Nikolaevich
Cand.Biol.Sci., senior lecturer

Карасев Сергей Геннадьевич
к.б.н.

Karasev Sergey Gennadievich
Cand.Biol.Sci.

Карасева Эмма Викторовна
к.б.н., профессор
*Кубанский государственный университет,
Краснодар, Россия*

Karaseva Emma Viktorovna
Cand.Biol.Sci., professor
Kuban State University, Krasnodar, Russia

Исследована возможность получения биомассы нефтеокисляющих микроорганизмов на среде, содержащей растительное масло в качестве единственного источника углерода и энергии. В лабораторных условиях и в натурном почвенном эксперименте подтверждена эффективность применения полученной биомассы при проведении работ по биоремедиации нефтезагрязнённых объектов. Показано, что использование в процессе культивирования растительного масла позволяет получить такое же количество биомассы как и на углеводном сырье, однако эффективность её использования выше, в среднем, на 20%

In the article we have studied the technology of obtaining a biomass of oil oxidizing microorganisms in a nutrient medium containing vegetable oil as the sole source of carbon and energy. In vitro and in soil experiment we have confirmed the effectiveness of the resulting biomass at work on bioremediation of oil contaminated sites. It is shown that the use of vegetable oil during culturing allows obtaining the same amount of biomass and carbohydrate raw materials, but the efficiency of its use is 20% higher, in average

Ключевые слова: АКТИНОБАКТЕРИИ,
КУЛЬТИВИРОВАНИЕ, БИОДЕГРАДАЦИЯ,
БИОРЕМЕДИАЦИЯ

Keywords: ACTINOBACTERIA, CULTIVATION,
BIODEGRADATION, BIOREMEDIATION

Развитие нефтяной промышленности приводит к росту нагрузок на окружающую среду посредством различного рода аварийных ситуаций, возникающих при добыче, хранении и транспортировке нефтепродуктов. Единственным экологически безопасным способом очистки загрязнённых земель является биоремедиация. Нефтеокисляющие актинобактерии широко используются в процессах биоремедиации. Это обусловлено их высокой углеводородокисляющей активностью и устойчивостью к

изменению факторов внешней среды. Изучение свойств нефтеокисляющих микроорганизмов представляет значительный интерес для задач микробиологии и биотехнологии, поскольку углеводородокисляющие актиномицеты, такие как *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gordonia*, в значительной степени определяют, как характер взаимоотношений между микроорганизмами внутри микробиоценоза, так и вносят решающий вклад в процессы биоремедиации и восстановление природного биоразнообразия [1-3]. Углеводородокисляющие актинобактерии применяются также для создания комплексных биопрепаратов, с целью интенсификации процессов биоремедиации и изучения взаимоотношений между различными группами микроорганизмов, входящих в состав этих препаратов [4-5]. Это даёт возможность моделировать процессы биоремедиации в лабораторных условиях для исследования их влияния на экологическую обстановку нефтезагрязнённых территорий. Для сокращения сроков накопления биомассы и повышения углеводородокисляющей активности применяются методы оптимизации условий жизнедеятельности микроорганизмов [6-7]. Увеличения выхода биомассы нефтеокисляющих актинобактерий удастся достигнуть при использовании углеводов в качестве единственного источника углерода. Накопление биомассы актинобактерий в среде культивирования возможно также за счет пента- и гексадекана [8], однако в первом случае значительно снижается углеводородокисляющая активность, а во втором случае, из-за дороговизны гексадекана, снижается экономическая эффективность [9]. В связи с этим приобретает актуальность поиск альтернативных источников углерода, обладающих невысокой стоимостью и не снижающих нефтеокисляющую активность актинобактерий в процессе культивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования послужили 6 штаммов нефтеокисляющих актинобактерий S-формы: *Nocardia* sp. J2, *Rhodococcus erythropolis* B2, *Rhodococcus erythropolis* F1 и R-формы: *Gordonia* sp. Z7, *Dietzia maris* J1, *Rhodococcus* sp. J8, выделенных из углеводородзагрязнённых объектов. При выборе штаммов руководствовались ранее проведёнными исследованиями, подтверждающими их высокую нефтеокисляющую активность [10]. Ранее было показано, что штаммы *Rhodococcus erythropolis* B2, *Rhodococcus erythropolis* F1, *Rhodococcus* sp J8 могут быть использованы в качестве основы при создании нефтеокисляющего биопрепарата, способного ликвидировать нефтяные загрязнения при наличии высоких концентраций тяжёлых металлов в среде [11].

Культивирование вели в стационарном ферментёре АК 210, а также ферментационном комплексе ОКА-01, что позволило существенно усилить массообмен, ускорить рост и сделать его глубинным и гомогенным, а не поверхностным в виде пленки. Засевную дозу выращивали на минеральной среде с сахарозой. В процессе культивирования поддерживали температуру 25°C, pH 7,2.

Определение степени биодеструкции. Остаточное содержание нефтепродуктов в минеральной среде и в нефтесодержащих отходах определяли по стандартной методике при помощи концентратомера КН-2М.

Для определения количества биомассы производили посев из кратных разведений на мясо-пептонном агаре (МПА, ЗАО "НИИ фармакотерапии", Россия, "ч.д.а.") в 3 повторностях. Чашки термостатировали при 25°C в течение 2-3 суток, после этого проводили

подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ) и определяли число КОЕ на 1 г (мл) субстрата [12].

Обработку результатов осуществляли с помощью статистического пакета Statistica 6.0

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При получении накопительной культуры нефтеокисляющих актинобактерий, используемых в процессе биоремедиации углеводородзагрязнённых объектов необходимо соблюдение двух основных условий. Во-первых, выход биомассы должен быть максимальным в кратчайшие сроки, а во-вторых, микроорганизмы должны сохранять наибольшее сродство к углеводородным компонентам питания. Следует также учитывать стоимость и доступность субстрата. В связи со сходными метаболическими путями расщепления микроорганизмами углеводов и растительного масла, последнее было выбрано в качестве возможного субстрата для выращивания накопительной культуры.

Наращивание накопительной культуры углеводородокисляющих бактерий проводили в трёх вариантах сред: питательном бульоне (как наиболее богатой среде), минеральной среде с растительным маслом и минеральной среде с гексадеканом в качестве единственного источника углерода, после чего выращенные штаммы высевали на минеральную жидкую среду с 0,1% нефти и культивировали до достижения стационарной фазы.

При культивировании микроорганизмов на богатой среде, такой как питательный бульон, для всех используемых в эксперименте штаммов удается получить максимальное количество биомассы, без существенных различий между S и R-формами. В варианте, когда в качестве единственного источника углерода и энергии используется гексадекан,

наблюдается несколько иная картина. Количество клеток, полученных при использовании этого субстрата значительно ниже, чем в варианте с питательным бульоном в качестве источника углерода и энергии (табл. 1).

Таблица 1 - Влияние источника углерода на выход биомассы актинобактерий, клеток/г.

Штаммы	Среда культивирования		
	Питательный бульон	Минеральная с гексадеканом	Минеральная с растительным маслом
<i>Rhodococcus erythropolis</i> F1	$5,0 \cdot 10^9$	$7,3 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^9$
<i>Rhodococcus erythropolis</i> B2	$4,2 \cdot 10^9$	$8,4 \cdot 10^8$	$5,5 \cdot 10^9$
<i>Nocardia</i> sp. J2	$4,5 \cdot 10^9$	$6,3 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^9$
<i>Dietzia maris</i> J1	$5,2 \cdot 10^9$	$3,7 \cdot 10^7$	$8,6 \cdot 10^8$
<i>Gordonia</i> sp. Z7	$6,3 \cdot 10^8$	$6,8 \cdot 10^7$	$9,3 \cdot 10^8$
<i>Rhodococcus</i> sp. J8	$3,0 \cdot 10^9$	$5,4 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^9$

Также проявляются некоторые различия между исследуемыми культурами. Количество клеток штаммов *Rhodococcus erythropolis* F1, *Rhodococcus erythropolis* B2 и *Nocardia* sp. J2, полученных за одинаковый промежуток времени на порядок больше, чем у штаммов *Dietzia maris* J1, *Gordonia* sp. Z7 и *Rhodococcus* sp. J8.

При переносе полученных на питательном бульоне культур в среду, содержащую нефть, наблюдается значительное снижение нефтеокисляющей способности, по сравнению с вариантом, когда используются микроорганизмы, выращенные на гексадекане.

Наибольшие различия в количествах потребленной нефти в зависимости от типа накопительной среды наблюдалась у штаммов *Dietzia maris* J1, *Gordonia* sp. Z7, *Rhodococcus* sp. J8, данные культуры при проведении работ по биоремедиации нецелесообразно выращивать на богатых средах, так как снижение нефтеокисляющей активности составляет от 25 до 35%. Следует отметить штаммы *Rhodococcus erythropolis* B2, для которого снижение нефтеокисляющей способности не превысило 10%, что позволяет в случае необходимости проводить в процессе биоремедиации интродукцию биомассы данного штамма выращенную на богатой среде без углеводов (рис. 1).

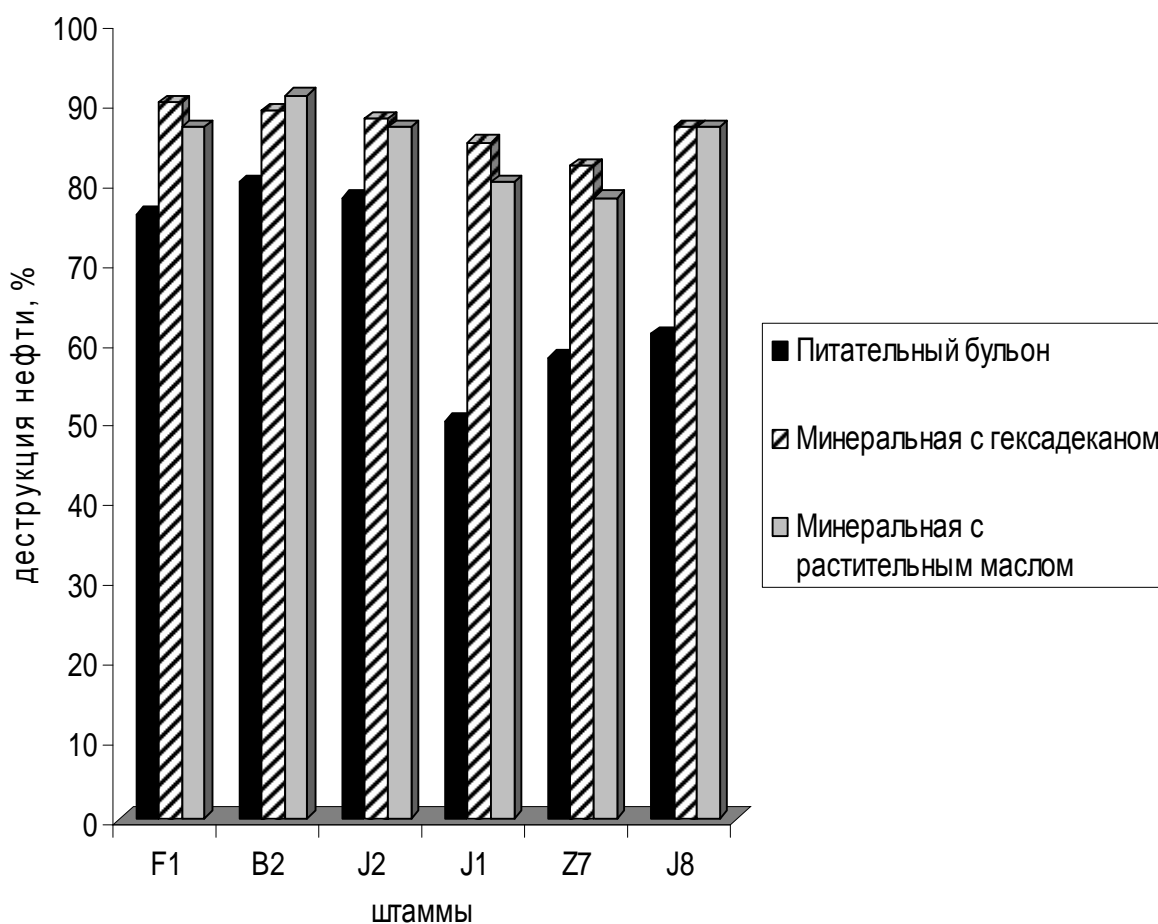


Рисунок 1. Влияние источника углерода на степень деструкции нефти (%) исследуемыми штаммами актинобактерий

Следует отметить также существующие общие различия между морфотипами. При переносе микроорганизмов из среды с питательным бульоном на среду с нефтью у представителей S-форм (*Rhodococcus erythropolis* F1, *Rhodococcus erythropolis* B2 и *Nocardia* sp. J2) снижение нефтеокисляющей активности не превышало 15%, в то время как у R-форм деструкция углеводородного субстрата снижалась не менее чем на 25%.

Использование в качестве источника углеродного питания растительного масла позволяет получать такое же количество биомассы, как и в варианте с питательным бульоном, причём нефтеокисляющая активность культуры остается неизменно высокой. При использовании растительного масла также значительно снижается риск заражения культуры посторонней микрофлорой, что немаловажно при промышленном производстве биопрепаратов, основанных на нефтеокисляющих микроорганизмах, а также при активации естественной нефтеокисляющей микрофлоры в условиях биоремедиации *in situ*.

Полученные результаты были апробированы на площадке биологической очистки ЗАО "КНПЗ-КЭН" при проведении работ по биоремедиации нефтесодержащих опасных отходов. На полигоне было заложено 3 экспериментальных участка площадью 100 м² каждый, на которых были размещены нефтесодержащие отходы слоем 30 см. с начальной концентрацией нефтепродуктов 127 г/кг. Каждый участок подвергался обработке биомассой наиболее активного, из исследуемых, нефтеокисляющего штамма *Rhodococcus erythropolis* B2. На участок №1 вносили биомассу, выращенную на сахарозе, на участок №2 вносили биомассу, выращенную на гексадекане, и на участок №3 вносили биомассу, выращенную на растительном масле в качестве единственных источников углерода и энергии. Внесение биомассы производили один раз в 15 суток из расчёта 10⁶ кл/г отходов, в это же время определяли остаточную концентрацию нефтепродуктов. Дополнительно производили внесение

необходимых биогенных элементов и факторов роста. На участке №1 в первые 15 суток наблюдалась существенная стагнация процесса деструкции нефтепродуктов, в то время как на участках 2 и 3 процесс элиминации углеводородов шел интенсивно уже с момента первого внесения нефтеокисляющих микроорганизмов (рис. 2).

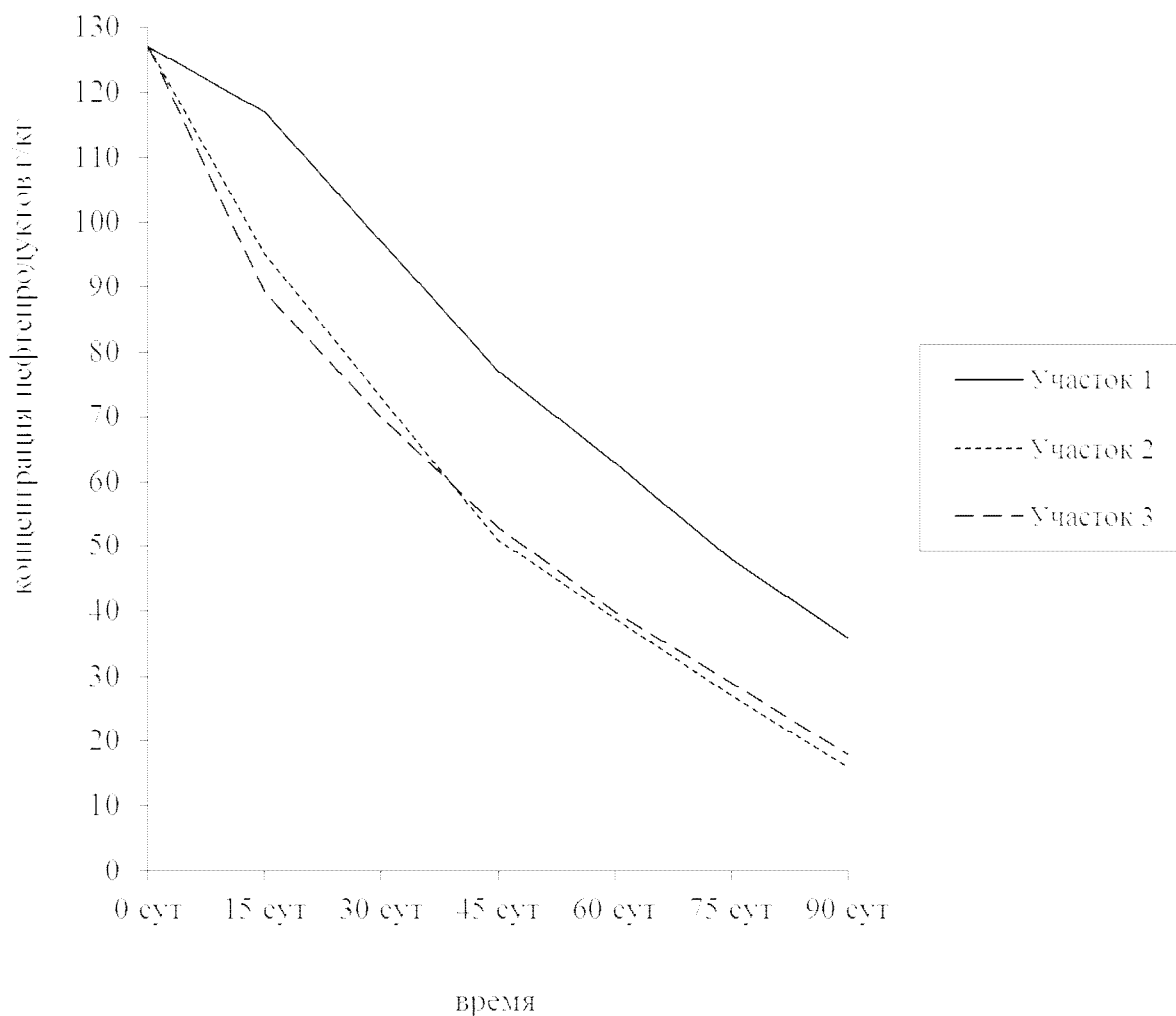


Рисунок 2. Динамика концентрации углеводородов на экспериментальных участках

После 30 суток относительная скорость деградации углеводородов выравнивается на всех экспериментальных участках, однако из-за задержки на первых этапах эффективность биоремедиации на втором и

третьем участках выше на 18-21%, чем на первом. Эта тенденция сохраняется и к моменту прекращения эксперимента на 90 сутки. Таким образом, при проведении работ по биоремедиации использование биомассы, полученной при культивировании на среде с гексадеканом или растительным маслом, позволяет сократить сроки проведения работ, в среднем на 20%. Статистически достоверной разницы в эффективности биоремедиации на участках 2 и 3 отмечено не было, что позволяет использовать растительное масло в качестве единственного источника углерода и энергии при получении биомассы нефтеокисляющих микроорганизмов как более экономически выгодный чем гексадекан субстрат.

Исследование проводилось в рамках выполнения НИР по государственному заданию Министерства образования и науки Российской Федерации.

Список литературы

1. Olivera N.L., Esteves J.L., Commendatore M.G. Alkane biodegradation by a microbial community from contaminated sediments in Patagonia, Argentina // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* - 1997. - V.40. - P.75-79.
2. MacNaughton S.J., Stephen J.R., Venosa A.D., Davis G.A., Chang Y.J., White D.C. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1999. - V.65. - P.3566-3574
3. Hanson, K. G., A. Nigam, M. Kapadia, and A. J. Desai Desai Bioremediation of crude oil contamination with *Acinetobacter* sp. A3 // *Curr. Microbiol.*, - 1997. – 35. – P.191-193
4. Korda A., Santas P., Tenete A., Santas R. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 1997. - V.48. - P.677-686.
5. Varadaraj R., Savage D.W. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil // *Environ. Sci. Technol.* - 1997. - V.31. - №7. - P.2012-2019.
6. Xu R., Obbard J.P. Optimization of slow-release fertilizer dosage for bioremediation of oil-contaminated beach sediment in a tropical environment // *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* - 2003. - V.19. - P.719-725
7. Sugiura K., Ishihara M., Shimauchi T., Harayama S. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil // *Environ. Sci. Technol.* - 1997. - V 31. - P.45-51.
8. Бердичевская М.В. Особенности физиологии родококков разрабатываемых нефтяных залежей // *Микробиология.* - 1989. - Т.58. - №1. - С.60-65.
9. Morgan P., Watkinson R.J. Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment // *Crit. Rev. Biotechnol.* - 1989. - V.8. - P.305-333.
10. Гирич И.Е., Малахов А.А., Гавриш Е.Ю., Карасева Э.В. Таксономическое разнообразие углеводородокисляющей микрофлоры в нефтезагрязненных почвах

Краснодарского края // Экобиотехнология: борьба с нефтяным загрязнением окружающей среды. – Пушино. - 2001. - С. 24-27

11. Худокормов А.А. Влияние источника углерода на устойчивость к тяжёлым металлам штаммов нефтеокисляющих актинобактерий, используемых в процессах биоремедиации / А.А. Худокормов, Э.В. Карасёва, А.А. Самков, Н.Н. Волченко, С.Г. Карасёв, Е.В. Батина // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ) [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2012. – №09(83)
12. Звягинцев Д.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. – М.: Изд-во МГУ, - 1991, - 231 с.

References

1. Olivera N.L., Esteves J.L., Commendatore M.G. Alkane biodegradation by a microbial community from contaminated sediments in Patagonia, Argentina // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* - 1997. - V.40. - P.75-79.
2. MacNaughton S.J., Stephen J.R., Venosa A.D., Davis G.A., Chang Y.J., White D.C. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1999. - V.65. - P.3566-3574
3. Hanson, K. G., A. Nigam, M. Kapadia, and A. J. Desai Desai Bioremediation of crude oil contamination with *Acinetobacter* sp. A3 // *Curr. Microbiol.*, - 1997. – 35. – P.191-193
4. Korda A., Santas P., Tenete A., Santas R. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 1997. - V.48. - P.677-686.
5. Varadaraj R., Savage D.W. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil // *Environ. Sci. Technol.* - 1997. - V.31. - №7. - P.2012-2019.
6. Xu R., Obbard J.P. Optimization of slow-release fertilizer dosage for bioremediation of oil-contaminated beach sediment in a tropical environment // *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* - 2003. - V.19. - P.719-725
7. Sugiura K., Ishihara M., Shimauchi T., Harayama S. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil // *Environ. Sci. Technol.* - 1997. - V 31. - P.45-51.
8. Berdichevskaja M.V. Osobennosti fiziologii rodokokkov razrabatyvaemyh neftnykh zalezhey // *Mikrobiologija.* - 1989. - T.58. - №1. - S.60-65.
9. Morgan P., Watkinson R.J. Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment // *Crit. Rev. Biotechnol.* - 1989. - V.8. - P.305-333.
10. Girich I.E., Malahov A.A., Gavrish E.Ju., Karaseva Je.V. Taksonomicheskoe raznoobrazie uglevodородokisljajushhej mikroflory v neftezagryaznennykh pochvakh Krasnodarskogo kraja // *Jekobiotehnologija: bor'ba s neftnym zagryazneniem okruzhajushhej sredy.* – Pushhino. - 2001. - S. 24-27
11. Hudokormov A.A. Vlijanie istochnika ugljeroda na ustojchivost' k tjazhjolym metallam shtammov nefteokisljajushhih aktinobakterij, ispol'zuemyh v processah bioremediacii / A.A. Hudokormov, Je.V. Karasjova, A.A. Samkov, N.N. Volchenko, S.G. Karasjov, E.V. Batina // *Politematicheskij setevoj jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta (Nauchnyj zhurnal KubGAU) [Jelektronnyj resurs].* – Krasnodar: KubGAU, 2012. – №09(83)
12. Zvjagincev D.G. Metody pochvennoj mikrobiologii i biohimii. – М.: Изд-во МГУ, - 1991, - 231 с.