УДК 628.31:628.35

© И. И. Иваненко, канд. техн. наук, доцент
© Е. Я. Лапатина, химик-микробиолог
(Санкт-Петербургский государственный
архитектурно-строительный университет,
Санкт-Петербург, Россия)
E-mail: i5657@mail.ru

DOI 10.23968/1999-5571-2020-17-4-144-149

© I. I. Ivanenko, PhD in Sci. Tech., Associate Professor
© E. Ya. Lapatina, chemist- microbiologist
(Saint Petersburg State University
of Architecture and Civil Engineering,
St. Petersburg, Russia)
E-mail: i5657@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЯ СЕЛЕКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ РАЗЛОЖЕНИЯ НЕФТЕПРОДУКТОВ С ПОВЫШЕННОЙ НИТРОГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ЛАБОРАТОРНОМ БИОРЕАКТОРЕ

RESEARCH OF SELECTION OF MICROORGANISMS FOR DECOMPOSITION OF PETROLEUM PRODUCTS WITH INCREASED NITROGENASE ACTIVITY IN LABORATORY BIOREACTOR

Приводятся результаты исследований по разложению нефтепродуктов на примере дизельного топлива в биореакторе с загрузкой из иммобилизованных микроорганизмов, специально селекционированных и адаптированных к деструкции углеводородов. В ходе работ из сырой нефти методом селекции было выделено 25 штаммов культур микроорганизмов, которые имели разную деструктивную активность относительно углеводородов парафиновой фракции дизельного топлива и азотфиксирующую способность. В ходе исследований проводили селекцию наряду с окислением углеводородов и по способности микроорганизмов к азотфиксации. Такие микроорганизмы позволяют при окислении углеводородов снизить содержание биогенов в очищенной воде. Часть микроорганизмов идентифицирована и исследована нитрогеназная активность псевдомонад. При росте на углеводородах дизельного топлива в биореакторе ассимиляция азота активнее всех протекает в культуре *Rhodococcus erythropolis* R-2 и равняется 10,52 нмоль C_2H_4 /мг белка в час. Максимальную нитрогеназную активность имеет полученная авторами ассоциация культур-деструкторов биореактора, которая при росте на нефтепродуктах дизельного топлива составляет 23,7 нмоль C_2H_4 /мг белка в час, что в 2,3 раза превышает азотфиксирующую способность *Rhodococcus erythropolis* R-2. Исследована скорость деструкции углеводородов — на седьмые сутки культивирования деструкция парафиновых углеводородов у сред без азота составляет 68 %, тогда как в присутствии аммонийного азота она достигала 87 %. Проведенными исследованиями установлена способность выделенных культур нефтеокисляющих бактерий использовать углеводороды в условиях ассимиляции атмосферного азота. Определена скорость процесса окисления.

Ключевые слова: биореактор, загрузка, селекция, иммобилизованные микроорганизмы, скорость деструкции, прирост микроорганизмов.

The article presents the results of studies on decomposition of petroleum products, on the example of diesel fuel, the investigation having been carried out in a bioreactor with loading of immobilized microorganisms specially selected and adapted to the destruction of hydrocarbons. In the course of the investigation, 25 micro-organism culture strains were isolated from crude oil by selection, the strains had different destructive activity relative to hydrocarbons of the paraffin fraction of diesel fuel and nitrogen-fixing ability. Further, selection was carried out along with oxidation of hydrocarbons and according to the ability of microorganisms to nitrogen fixation. Such microorganisms during oxidation of hydrocarbons will allow reducing the content of biogens in purified water. Part of the microorganisms was identified and the nitrogenase activity of pseudomonades was investigated. When growing on diesel hydrocarbons in a bioreactor, nitrogen assimilation is most active in *Rhodococcus erythropolis* R-2 culture and equals 10.52 nmol C_2H_4 /mg protein per hour. The maximum nitrogenase activity has the association of bioreactor destructive cultures obtained by the authors, which, when growing on diesel oil products is 23.7 nmol C_2H_4 /mg protein per hour, which is 2.3 times higher than the nitrogen-fixing capacity of *Rhodococcus erythropolis* R-2. There was studied the rate of hydrocarbon degradation, on the seventh day of cultivation, the degradation of paraffinic hydrocarbons in nitrogen-free media is 68%, whereas in the presence of ammonium nitrogen it reached — 87 %. These investigations have determined the ability of isolated cultures of oil-oxidizing bacteria to use hydrocarbons under atmospheric nitrogen assimilation conditions.

Keywords: bioreactor, loading, selection, immobilized microorganisms, rate of destruction, growth of microorganisms.

Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами — результат технического прогресса и деятельности человека. Попадание нефтепродуктов в окружающую среду с промышленными и ливневыми водами, техногенные катастрофы, сопровождающиеся разливами нефти, пагубно влияют на природный биоценоз и нуждаются в разработке новейших методов охраны окружающей среды от этих загрязнений [1, 2].

Работа автотранспорта, при которой образующиеся пленочные загрязнения на поверхности почвы и газообразные выбросы в атмосфере смываются ливневыми водами, предприятий химической, нефтеперерабатывающей и нефтехимической промышленности, сточные воды промышленных предприятий, многочисленные разливы нефти и нефтепродуктов в результате аварий трубопроводов и нефтеналивных танкеров, аварий и пожаров на нефтехранилищах и нефтеперегонных заводах приводят к загрязнению воды и почвы значительными количествами сырой нефти и продуктов ее переработки, создают серьезную экологическую угрозу. При санитарно-химическом контроле определяют, как правило, сумму растворенных, эмульгированных и сорбированных форм нефти.

Наиболее перспективным методом с точки зрения экологического воздействия на окружающую среду является биологическая очистка водной среды и почв от нефтяного загрязнения, которая основана на способности микроорганизмов расщеплять и перерабатывать нефтяные углеводороды [3, 4]. Эти микроорганизмы не являются узкоспециализированными и от представителей всех других родов микроорганизмов их отличает:

- способность к поглощению гидрофобных соединений;
- наличие углеводородоксилирующих ферментов.

Существуют два принципиальных подхода к биодegradации нефтяного загрязнения в естественной среде:

- стимуляция естественной нефтеокисляющей микрофлоры путем создания оптимальных условий для ее развития (внесение азотных фосфорных удобрений, аэрация и пр.);

- введение в загрязненную экосистему активных углеводородоксилирующих микроорганизмов наряду с добавками солей азота и фосфора.

В данном исследовании приведены принципы и подходы к реализации второго метода на практике.

Методика проведения исследований. Из литературных источников известна высокая заселенность нефтепродуктов микроорганизмами [5, 6]. Для селекции азотфиксирующей ассоциации нефтеокисляющих микроорганизмов возможно использование аборигенной микрофлоры сырой нефти [7]. Из сырой нефти ООО ПО «Киришинефтеоргсинтез» методом двойной селекции по методике О. В. Клямар и Л. С. Самойленко была выделена ассоциация азотфиксирующих нефтеокисляющих микроорганизмов с деструктивными и иммобилизованными свойствами, которая состояла из бактерий и дрожжеподобных грибов [8–10]. Селекцию проводили и по третьему признаку — способности микроорганизмов к азотфиксации (такие микроорганизмы позволят снизить при окислении углеводородов и содержание биогенов в очищенной воде). Селекцию проводили в лабораторном биореакторе, выполненном из корпуса емкости очистной станции Vortex 5 с полезным объемом биореактора 22 дм³. Исследования проводились в условиях проточного культивирования (см. рисунок). Биореактор сконструирован так, что неполными перегородками он разделен на шесть отсеков. Это обеспечивает зигзаговидное движение воды в сооружении. В первый отсек вносили дизельное топливо в количестве 0,11 дм³. Из второго отсека вода рециркулировала через слой нефтепродуктов первого отсека для насыщения ее углеводородами и интенсивной селекции микроорганизмов-деструкторов. Кроме того, в первый отсек непрерывно подавали водный раствор биогенных элементов — фосфор, калий, магний и микроэлементы со скоростью примерно 0,01 ч⁻¹, при этом азот не вносили.

Ассоциации других микроорганизмов, кроме селектированных, специально также не использовали. Отсутствие доступного источника азота (незначительная его концентрация) дает селективное преимущество в этих экстремальных условиях для развития микроорганизмов, которые способны обеспечивать свои метаболи-

Схема биореактора в условиях проточного культивирования: а — отсеки: 1 — воздух; 2 — минеральный раствор; 3 — слой нефтепродуктов; 4 — эрлифт; 5 — волокнистый носитель; 6 — очищенная вода; б и в — фотографии лабораторного биореактора; д — волокнистый носитель до и после исследований. Фотографии сделаны (б — 23.03.2019; в — 24.10.2019) на этапе наращивания активного ила в свободной емкости установки перед внесением носителя для иммобилизации и после извлечения загрузки

ческие потребности в азоте путем ассимилирования его из атмосферы.

В 3–6 отсеках лабораторного биореактора размещали по 150 г волокнистого носителя для иммобилизации и наращивания на нем биомассы нефтеокисляющих азотфиксирующих микроорганизмов в процессе селекции. Микрокомпрессором осуществляли постоянную аэрацию среды в биореакторе при средней концентрации растворенного кислорода на уровне 2–2,5 мгО₂/л. Процесс проводили при температуре 10–25 °С. В очищенной воде после биореактора определяли концентрацию нефтепродуктов по стандартной весовой методике и в некоторых опытах — методом атомно-сорбционной спектрофотометрии.

После образования биопленки на поверхности волокнистого носителя исследовали деструктивную активность иммобилизованной азотфиксирующей ассоциации микроорганизмов. Кроме того, по мере накопления на носителе значительной биомассы ее вынимали из установки, высушивали и хранили для последующих исследований и использования с целью очистки воды от нефтепродуктов в реальных условиях, а в биореактор добавляли новый волокнистый носитель без микроорганизмов.

Результаты исследований. В проведенных исследованиях создание оптимальных условий культивирования «аборигенных» микроорганизмов нефти путем внесения необходимых биогенных элементов (фосфора, калия, магния и микроэлементов) и речной воды привело к интенсивному их размножению уже на пятые сутки проведения опыта. Развитие микроорганизмов в первые сутки культивирования сопровождалось образованием большого количества слизи, что приводило к эмульгированию нефтепродуктов и, как результат, увеличивало их концентрацию в воде до 1000 мг/дм³. Продуцирование клетками значительных количеств слизи можно объяснить отсутствием в культуральной среде доступных соединений азота, потому что в безазотной среде микроорганизмы синтезируют полисахариды. По мере размножения и наблюдающегося при помощи ежедневного микроскопирования ила, доминирования в биореакторе микроорганизмов, которые способны обеспечивать свои потребности в азоте путем азотфиксации, сли-

зеообразование значительно уменьшилось, а со временем полностью прекратилось.

Через месяц работы лабораторного биореактора селекционированная ассоциация азотфиксирующих микроорганизмов-деструкторов нефтепродуктов минерализовала 10 г дизельного топлива за сутки при концентрации иммобилизованных клеток в сооружении 200 г (по сухой массе) вещества. В свободно плавающем состоянии количество клеток не превышало 10⁴ кл/см³. При внесении 100 см³ сырой нефти в первый отсек установки полное ее разложение происходило за 31 сутки, то есть за сутки 200 г биомассы (по сухой массе) перерабатывала (расщепляла) 2,3 г нефтепродуктов. Пленка нефти в первом отсеке практически отсутствовала, а в растворе концентрация углеводородов не превышала 0,3 мг/дм³ при скорости циркуляции (разведения) 0,01 ч⁻¹.

Значительно более медленно проходило расщепление углеводородов сырой нефти в биореакторе по сравнению с дизельным топливом (10 г за сутки против 2,3 г за сутки) при одинаковом количестве биомассы. Такой результат обусловлен присутствием в нефти очень стойких к окислению, даже селекционированными микроорганизмами, высокомолекулярных полициклических ароматических и гетероциклических соединений.

Из селекционированной ассоциации биоценоза биореактора было выделено 25 штаммов культур микроорганизмов, которые имели разную деструктивную активность относительно углеводородов парафиновой фракции дизельного топлива и азотфиксирующую способность. Наиболее активные идентифицированы [11, 12]. При оптической плотности суспензии 10⁶–10⁷ кл/см³ изолированные штаммы в условиях азотфиксации используют нефтепродукты с разной эффективностью. Наибольшая степень деструкции углеводородов парафиновой фракции дизельного топлива в условиях азотфиксации характерна для штамма *Rhodococcus erythropolis* R-2 — 680 мг/дм³сут. За семь суток она становится 58 % при начальном внесении 8,26 г/дм³. В среде с достаточным обеспечением клеток аммонийным азотом эта величина достигает 72 %, то есть за сутки минерализуется 850 мг/дм³ углеводородов. Для наиболее актив-

ных из выделенных культур эта величина при росте на углеводородах дизельного топлива составила:

<i>Yarrowia lipolytica</i>		83 мг/дм ³ сут
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	R-2	680 - " -
<i>Pseudomonas rathonis</i>	P-17	440 - " -
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Z-1	410 - " -
<i>Azotobacter sp.</i>		450 - " -
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	P-9	420 - " -
<i>Arthrobacter tumescens</i>	A-7	310 - " -

Нитрогеназную активность выделенных штаммов-деструкторов определяли ацетилен-редуктивным методом [13] при культивировании в жидкой модифицированной среде CS7 [14], где единственными источниками углерода и энергии была глюкоза (контроль) и дизельное топливо (опыт) в количестве 10 г/дм³. Белок в опытах определяли по Лоури [15].

В результате исследования нитрогеназной активности была установлена способность бактериальных штаммов ассимилировать атмосферный азот. Наибольшую нитрогеназную активность при росте на глюкозе проявляет штамм *Azotobacter sp.*, нитрогеназная активность которого составляет 12,82 Нмоль C₂H₄/мг белка в час. В то же время при росте на углеводородах дизельного топлива ассимиляция азота активнее протекает в чистой культуре *Rhodococcus erythropolis* R-2 и равняется 10,52 Нмоль C₂H₄/мг белка в час. Максимальную нитрогеназную активность имеет ассоциация культур-деструкторов в биореакторе, которая при росте на нефтепродуктах дизельного топлива составляет 23,7 Нмоль C₂H₄/мг белка в час, что в 2,3 раза превышает азотфиксирующую способность *Rhodococcus erythropolis* R-2. В условиях периодического культивирования исследованы деструктивные свойства ассоциации. Результаты показали, что на седьмые сутки культивирования деструкция парафиновых углеводородов у сред без азота составляет 68 %, тогда как в присутствии аммонийного азота она достигала 87 %.

Выводы

1. Биологическая очистка загрязнений признана во всем мире самым перспективным направлением в трансформации загрязняющих

веществ. Введение в загрязненную экосистему активных углеводородокисляющих микроорганизмов позволит снижать антропогенное загрязнение токсичными веществами с минимальными воздействиями на окружающую среду ввиду высокой экологичности метода трансформации. В представленных опытах было выделено 25 штаммов культур микроорганизмов селекционированной ассоциации биоценоза биореактора, полученных из нефти, которые имели разную деструктивную активность относительно углеводородов парафиновой фракции дизельного топлива.

2. Активность и способность микроорганизмов к переработке углеводородных загрязнений зависит от наличия питательных веществ в обрабатываемой среде. На практике для создания оптимальных условий использования микроорганизмов обычно применяют добавки солей азота и фосфора, что зачастую приводит к биогенному вторичному загрязнению очищаемой воды или почвы и повышенным расходам на процесс. В результате исследования нитрогеназной активности была установлена способность бактериальных штаммов ассимилировать атмосферный азот и определены представители, обладающие максимальной скоростью ассимиляции.

3. Проведенными исследованиями установлена способность выделенных культур нефтеокисляющих бактерий использовать углеводороды в условиях ассимиляции атмосферного азота, причем эффект этот значительно выше при применении ассоциаций микроорганизмов-деструкторов.

Библиографический список

1. Арустамов Э. А., Левакова И. В., Баркалова Н. В. Экологические основы природопользования. М.: Издательско-торговая корпорация «Дашков и К°», 2003. 280 с.
2. Степанов В. Н. Мировой океан. М.: Знание, 1994. 420 с.
3. Степанов С. В. Биологическая очистка и доочистка сточных вод нефтеперерабатывающих и нефтехимических предприятий: дис. ... д-ра техн. наук: 05.23.04. Самара, 2014. 345 с.
4. Морозова К. М. Принципы расчета систем биологической очистки сточных вод // Водоснабжение и санитарная техника. 2009. № 1. С. 26–31.

5. Tricolici O., Bumbac C., Patroescu V., Postolache C. Dairy wastewater treatment using activated sludge – microalgae system at different light intensities // *Water Science & Technology*. 2013. Vol. 69 (8). Pp. 1598–1605.

6. Леффлер У. Л. Переработка нефти. М.: Олимп-Бизнес, 2005. 224 с.

7. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты: пер. с англ. В 2 т. М.: Мир, 1982. Т. 1. 392 с.

8. Григорьева Т. В. Роль азотфиксирующих микроорганизмов в фиторемедиации промышленных углеводородных шламов: автореф. дис. ... канд. биол. наук / ГОУ ВПО «Казанский государственный университет В. И. Ульянова-Ленина». Казань, 2009. 23 с.

9. Клямар О. В., Самойленко Л. С., Нагорная С. С., Гвоздяк П. И. Азотфиксирующие микроорганизмы-деструкторы нефтепродуктов // *Химия и технология воды*. 2002. Т. 24, № 3. С. 271–282.

10. Квасников Е. Й., Писарчук Е. Н. Артробактер в природе и производстве. Киев: Наукова думка. 1980. 220 с.

11. Смирнов В. В., Киприанова Е. А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев: Наукова думка. 1990. 264 с.

12. Gösta, Bylund. Dairy processing handbook. Lund, Sweden : Tetra Pak Processing Systems AB, 2003. 452 p.

13. Hardy R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K., Burns R. C. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation // *Plant Physiol.* 1968. Vol. 43, № 8. Pp. 1185–1207.

14. Pagan J. D., Child J. J., Scovicroff W. R., Gibson A. H. Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on defined medium // *Nature*. 1975. № 5516. Pp. 406–407.

15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Far A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* Vol. 193, № 1. Pp. 265–275.

References

1. Arustamov E. A., Levakova I. V., Barkalova N. V. *Ekologicheskie osnovy prirodopol'zovaniya* [Ecological bases of nature management]. Ed. by Arustamov E. A. Moscow, Dashkov i Ko Publ., 2003, 280 p.

2. Stepanov V. N. *Mirovoy okean* [World Ocean]. Moscow, Znanie Publ., 1994, 420 p.

3. Stepanov S. V. *Biologicheskaya ochistka i doochistka stochnykh vod neftepererabatyvayushchikh i neftekhimicheskikh predpriyatiy*. Diss. dokt. tekhn. nauk [Biological treatment and post-treatment of waste water of

oil refining and petrochemical enterprises. Dr. Sci. Tech. diss.]. Samara, 2014. 345 p.

4. Morozova K. M. *Printsipy rascheta sistem biologicheskoy ochistki stochnykh vod* [Principles of calculation of biological wastewater treatment systems]. *Vodosnabzhenie i sanitarnaya tekhnika – Water supply and sanitary equipment*, 2009, no. 1, pp. 26–31.

5. Tricolici O., Bumbac C., Patroescu V., Postolache C. Dairy wastewater treatment using activated sludge – microalgae system at different light intensities. *Water Science & Technology*, 2013, vol. 69 (8), pp. 1598–1605.

6. Leffler U. L. *Pererabotka nefti* [Oil refining]. Moscow, Olimp-Biznes Publ., 2005, 224 p.

7. Dikson M., Uebb E. *Fermenty* [Ferments]. In 2 vols. Transl. from English. Moscow, Mir Publ., 1982, vol. 1, 392 p.

8. Grigor'eva T. V. *Rol' azotfiksiruyushchikh mikroorganizmov v fitoremeditatsii promyshlennykh uglevodorodnykh shlamov*. Avtoref. diss. kand. biol. nauk [The role of nitrogen-fixing microorganisms in phytoremediation of industrial hydrocarbon slurries. Author's thesis of PhD in Sci. Bio. diss.]. Kazanskiy gosudarstvenniy universitet V. I. Ulyanova-Lenina Publ., Kazan, 2009, 23 p.

9. Klyamar O. V., Samoylenko L. S., Nagornaya S. S., Gvozdyak P. I. *Azotfiksiruyushchie mikroorganizmy-destruktory nefteproduktov* [Nitrogen-fixing microorganisms-destroyers of petroleum products]. *Ximiya i tekhnologiya vody – Chemistry and technology of water*, 2002, vol. 24, no. 3, pp. 271–282.

10. Kvasnikov E. Y., Pisarchuk E. N. *Artrobakter v prirode i proizvodstve* [Arthrobacter in nature and production]. Kiev, Naukova dumka Publ., 1980, 220 p.

11. Smirnov V. V., Kiprianova E. A. *Bakterii roda Pseudomonas* [Bacteria of the Pseudomonad type]. Kiev, Naukova dumka Publ., 1990, 264 p.

12. Gösta Bylund. Dairy processing handbook. Lund, Sweden. *Tetra Pak Processing Systems AB*, 2003. 452 p.

13. Hardy R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K., Burns R. C. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.*, 1968, vol. 43, no. 8, pp. 1185–1207.

14. Pagan J. D., Child J. J., Scovicroff W. R., Gibson A. H. Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on defined medium. *Nature*, 1975, no. 5516, pp. 406–407.

15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Far A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275.