

УДК 759.873.088.5:661.185

**ДЕСТРУКЦИЯ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ В ПРИСУТСТВИИ
ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS*
IMB B-7241, *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* IMB Ac-5017 И *NOCARDIA VACCINII*
IMB B-7405**

Пирог Т.П., Софилканич А.П., Гриценко Н.А.

Национальный университет пищевых технологий

ул. Владимирская, 68, Киев, 0160, Украина

tapirog@nuft.edu.ua

АБСТРАКТ

На сегодняшний день нефть является основным источником энергии во всем мире, но вместе с тем повышается и вероятность попадания этого ксенобиотика в окружающую среду. Для устранения разливов нефти обычно используются физические и механические методы, однако они не всегда являются достаточно эффективными. Перспективными для ликвидации нефтяных загрязнений являются биологические методы, основанные на непосредственном внесении нефтеокисляющих микроорганизмов (биоаугментация) или использовании различных соединений, стимулирующих природную (автохтонную) микробиоту (биостимуляция), в том числе и микробных поверхностно-активных веществ. Благодаря экологической безопасности, способности эмульгировать гидрофобные соединения и повышать эффективность разложения ксенобиотиков, микробные ПАВ могут найти широкое применение в природоохранных технологиях. В статье описано применение поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 и *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 для интенсификации разложения нефти в воде и почве. Показано, что после обработки культуральной жидкостью, содержащей поверхностно-активные вещества, степень деструкции нефти в воде (2,6-6,0 г/л) и почве (21,4 г/кг) через 30 сут. составляла 80-94%. Предполагается, что основным механизмом, обеспечивающим активную деструкцию нефти в воде в присутствии препаратов поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405, является активация ими природной нефтеокисляющей микробиоты.

Ключевые слова: интенсификация деструкции нефти, микробные поверхностно-активные вещества, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405.

**ELIMINATION OF OIL POLLUTION IN THE PRESENCE OF SURFACTANTS
PRODUCED BY *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241, *RHODOCOCCUS*
ERYTHROPOLIS IMV Ac-5017 AND *NOCARDIA VACCINII* IMV B-7405**

Pirog T.P., Sofilkanych A.P., Grytsenko N.A.

National University of Food Technologies

68, Vladimirskaya str., Kiev, 0160, Ukraine

tapirog@nuft.edu.ua

ABSTRACT

Oil is currently the main source of energy used worldwide, which in turn increases the probability of this xenobiotic compound entering the environment. The physical and mechanical methods commonly used to eliminate oil spills are not always effective. Biological methods to eliminate oil pollution, based on direct introduction of oxidizing microorganisms (bioaugmentation) or the use of various compounds that stimulate the natural (autochthonous) microbiota (biostimulation), including microbial surface-active substances

(surfactants) show much promise. Due to environmental safety, the ability to emulsify hydrophobic compounds, and improve the efficiency of microbial degradation of xenobiotics, surfactants can be widely used in environmental technologies. The article describes the use of surface-active substances (surfactants) produced by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 to intensify the removal of oil from water and soil. It was shown that the degree of oil degradation in water (2.6-6.0 g/L) and soil (21.4 g/kg) in 30 days was 80-94% after treatment with the liquid microbial culture containing surfactants. It is assumed that the activation of the natural oil-oxidizing microbiota, primarily contributes to the degradation of oil present in water, in the presence of surfactants produced by *A. calcoaceticus* IMV B-7241, *R. erythropolis* IMV Ac-5017, and *N. vaccinii* IMV B-7405.

Keywords: intensification of oil degradation, microbial surfactants, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Nocardia vaccinii* IMV B-7405.

ВВЕДЕНИЕ

Почва и водные системы способны накапливать большие количества различных по составу, физико-химическим свойствам и концентрации загрязняющих веществ. Наличие ксенобиотиков в окружающей среде является следствием их нецелевого использования, несовершенства технологий и очистных систем [1]. Процессы добычи, транспортировки, переработки нефти постоянно сопровождаются аварийными выбросами сырья в водоемы и почву [1, 2].

На сегодняшний день для очистки воды и почвы от нефтяных загрязнений преимущественно используются биопрепараты, представляющие собой лиофилизированную биомассу (или пасту) нефтеокисляющих бактерий [3]. Наиболее известные микробные деструкторы нефти являются представителями родов *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Paenibacillus*, *Ralstonia*, *Brevibacterium*, *Dietzia*, *Burcholderia* и *Aeromicrobium* [2, 4]. Такой способ очистки называется биоаугментацией [2]. Однако микроорганизмы, интродуцированные в загрязненные нефтью экосистемы, требуют определенное время для адаптации к новым условиям существования. В связи с этим более эффективным (по сравнению с биоаугментацией) является другой способ очистки – биостимуляция, предполагающая использование различных веществ, в том числе и питательных, стимулирующих автохтонную (природную) микробиоту [2, 4]. Эффективными стимуляторами природной нефтеокисляющей микробиоты являются микробные ПАВ [2, 4, 6-10].

Механизм действия микробных ПАВ связан с процессами десорбции, солубилизации органических загрязнителей и, как следствие, повышением их биодоступности для микроорганизмов. Предлагаются различные варианты применения микробных ПАВ для очистки: использование микроорганизмов-продуцентов ПАВ для утилизации нефти и продуктов ее переработки; очистка наиболее загрязненных участков растворами ПАВ в биореакторах; обработка загрязненной зоны растворами ПАВ для солубилизации углеводородов, что стимулирует развитие природной нефтеокисляющей микробиоты (биостимуляция) [10].

Ранее мы сообщали о выделении нефтеокисляющих бактерий *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, *Nocardia vaccinii* К-8 и использовании иммобилизованных на керамзите клеток штаммов ЭК-1 и К-8 для очистки воды от нефти (100 мг/л) [11]. В работе [12] было показано, что степень утилизации сырой нефти (2 об.%) к 192 ч выращивания накопительной культуры нефтеокисляющих бактерий составляла 84%, а при введении в нее активного углеводородокисляющего штамма *R. erythropolis* ЭК-1 повышалась до 90%.

В дальнейших исследованиях была установлена способность *A. calcoaceticus* К-4 (IMV B-7241), *R. erythropolis* ЭК-1 (IMV Ac-5017) и *N. vaccinii* К-8 (IMV B-7405) к синтезу поверхностно-активных веществ [13-15].

Цель работы – исследовать влияние ПАВ *A. calcoaceticus* IMB В-7241, *R. erythropolis* IMB Ас-5017 и *N. vaccinii* IMB В-7405 на эффективность деструкции нефти в почве и воде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследований

Основными объектами исследований являлись штаммы *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 и *Nocardia vaccinii* К-8, зарегистрированные в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного Национальной академии наук Украины под номерами IMB Ас-5017, IMB В-7241 и IMB В-7405 соответственно.

По химической природе внеклеточные ПАВ *R. erythropolis* IMB Ас-5017 являются комплексом глико- (трегалозомоно- и димиколаты), нейтральных (цетиловый спирт, пальмитиновая кислота, метиловый эфир н-пентадекановой кислоты, миколовые кислоты) и фосфолипидов (фосфатидилглицерин, фосфатидилэтанолламин) [15]. В составе внеклеточных ПАВ *A. calcoaceticus* IMB В-7241 выявлены глико- (трегалозомоно- и димиколаты, трегалозомоно- и диацелаты) и аминоклипыды [13]. Штамм IMB В-7405 синтезирует комплекс внеклеточных нейтральных, глико- и аминоклипыдов [14]. Нейтральные липиды представлены миколовыми и н-алкановыми кислотами, гликолипыды – трегалозодиацелатами и трегалозомиколатами.

В работе использовали нефть из месторождения Долина Ивано-Франковской обл. (Украина) плотностью 0,85 г/см³ и биопрепарат «Деворойл» (производитель ООО «Микробные технологии», с 2012 года – ООО «Сити Строй» г. Москва).

Состав сред и условия культивирования

R. erythropolis IMB Ас-5017 выращивали на жидкой минеральной среде (г/л): NaNO₃ – 1,3, MgSO₄·7H₂O – 0,1, NaCl – 1,0, Na₂HPO₄ – 0,6, KH₂PO₄ – 0,14, FeSO₄·7H₂O – 0,01, pH 6,8-7,0. В качестве субстрата использовали этанол, н-гексадекан и отработанное (пережаренное) подсолнечное масло в концентрации 2 об. %.

Для культивирования *A. calcoaceticus* IMB В-7241 использовали питательную среду следующего состава (г/л): (NH₂)₂CO – 0,35, MgSO₄·7H₂O – 0,1, NaCl – 1,0, Na₂HPO₄ – 0,6, KH₂PO₄ – 0,14, pH 6,8-7,0. В среду дополнительно вносили дрожжевой автолизат – 0,5 об. % и раствор микроэлементов – 0,1 об. % [12]. Источник углерода – н-гексадекан и этанол в концентрации 2 об. %.

Штамм *N. vaccinii* К-8 выращивали на синтетической питательной среде (г/л): NaNO₃ – 0,5, MgSO₄·7H₂O – 0,1, CaCl₂·2H₂O – 0,1, KH₂PO₄ – 0,1, FeSO₄·7H₂O – 0,01, дрожжевой автолизат – 0,5 об. % (по объему). Источник углерода и энергии – глицерин в концентрации 1,0 об. %.

В качестве инокулята использовали культуры из экспоненциальной фазы роста, выращенные на соответствующих жидких средах, содержащих 0,5-1 об. % субстрата. Количество посевного материала (10⁴–10⁵ кл./мл) составляло 5-10% от объема питательной среды. Культивирование бактерий осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 28-30°C в течение 120 ч.

Определение показателей синтеза ПАВ

Концентрацию внеклеточных ПАВ (г/л) определяли после экстракции их из супернатанта смесью Фолча, как описано ранее [13-15].

Получение препаратов ПАВ

В качестве препаратов ПАВ использовали постферментационную культуральную жидкость и супернатант. Для получения супернатанта культуральную жидкость,

полученную после культивирования штаммов IMB Ac-5017, IMB B-7241 и IMB B-7405 на этаноле и глицерине, центрифугировали (5000 g) в течение 30 мин.

Для получения супернатанта культуральной жидкости, полученной после культивирования штамма IMB Ac-5017 на отработанном подсолнечном масле, к ней добавляли бензин (1:1). При этом остатки субстрата вместе с гидрофобными клетками переходили в верхнюю фракцию, а в нижней оставался супернатант. Операцию повторяли трижды, после чего освобожденный от клеток и остатков бензина (упаривание на роторном испарителе ИР-1М2 (Россия) супернатант использовали в качестве препарата для очистки от нефти. Получение супернатанта культуральной жидкости после выращивания штаммов на n-гексадекане осуществляли аналогично, используя для удаления остатков субстрата гексан.

Исследование биодеструкции нефти

Моделирование загрязненной нефтью почвы. В пластиковую емкость вносили 1 кг почвы, 25 мл нефти, препараты ПАВ (100-300 мл), 0,01% диаммонийфосфата в качестве источника биогенных элементов и перемешивали. Образцы каждые три дня перемешивали для улучшения аэрации и увлажняли стерильной водой. Продолжительность эксперимента 20-30 сут.

Моделирование загрязненных нефтью водоемов. В пластиковую емкость вносили 2 л бюветной воды, на поверхность которой наносили 6-15 мл нефти, после чего добавляли препараты ПАВ в концентрации 5-15 об.%. В качестве источника биогенных элементов использовали диаммонийфосфат (0,01%). Общее количество живых клеток в бюветной воде в течение эксперимента (20-30 сут) определяли по методу Коха на МПА.

Определение содержания нефти. Количество нефти определяли весовым методом. Для этого осуществляли трехкратную экстракцию нефти гексаном (соотношение 1:1). Органический экстракт упаривали до постоянной массы на роторном испарителе ИР-1М2 (Россия) при температуре 55°C и абсолютном давлении 0,4 атм.

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по Лакину [16]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние препаратов ПАВ на эффективность микробной деструкции нефти в воде

Литературные данные [17] свидетельствуют, что наиболее эффективное удаление углеводов достигается при использовании микроорганизмов, способных ассимилировать нефть с одновременным синтезом ПАВ.

В связи с этим в качестве основных препаратов для нефтеочистки мы использовали культуральную жидкость, содержащую как клетки нефтеокисляющих бактерий, так и образуемые ими ПАВ. Установлено, что концентрация внеклеточных ПАВ в культуральной жидкости, полученной после культивирования штаммов IMB B-7241 и IMB Ac-5017 на этаноле, а штамма IMB B-7405 на глицерине составляла 1,7, 1,5 и 1,8 г/л соответственно.

Данные по количественному определению остаточной нефти в воде через 30 сут после обработки препаратами ПАВ представлены в таблице 1. В присутствии препаратов ПАВ в виде культуральной жидкости и супернатанта степень деструкции нефти в воде составляла 80-94%. Максимальное разложение нефти (92-94%) наблюдалось при использовании невысоких (5%) препаратов ПАВ всех исследуемых штаммов в виде культуральной жидкости. Отметим однако, что существенной разницы в интенсификации

процессов деструкции нефти препаратами ПАВ различной концентрации, а также препаратами ПАВ в виде культуральной жидкости и супернатанта не обнаружено.

Эти данные свидетельствуют о том, что клетки продуцентов ПАВ практически не участвуют в разложении нефти в воде. Такое явление может быть обусловлено следующими причинами. Во-первых, в культуральной жидкости исследуемых штаммов концентрация биомассы невысокая – 1,0-1,2 г/л. Так как концентрация культуральной жидкости в загрязненной нефтью воде составляет 5-15% (таблица 1), то содержание в воде биомассы продуцентов ПАВ не превышает 0,05-0,15 г/л. Во-вторых, после интродукции штаммам-продуцентам требуется время на адаптацию к новым условиям. В-третьих, вполне вероятно, что скорость ассимиляции нефти природной микробиотой воды выше, чем ПАВ-синтезирующими штаммами IMB Ac-5017, IMB B-7241 и IMB B-7405.

Таблица 1. Показатели очистки воды от нефти препаратами ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405

Table 1. Indicators of water purification from oil by preparations of *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 and *N. vaccinii* IMB B-7405 surfactants

Штамм-продуцент ПАВ Producer of surfactant	Препарат ПАВ Preparation of surfactant	Концентрация препарата ПАВ, % Concentration of surfactant preparation, %	Концентрация остаточной нефти, г/л Concentration of residual oil, g/l	Степень деструкции нефти, % Degree of oil degradation, %
<i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	Культуральная жидкость	5	0,20±0,010	92,3
		10	0,32±0,015	87,7
		15	0,36±0,018	88,2
	Супернатант	5	0,44±0,022	83,1
		10	0,32±0,015	85,7
		15	0,38±0,019	85,4
<i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017	Культуральная жидкость	5	0,18±0,009	93,1
		10	0,17±0,008	93,5
		15	0,17±0,008	93,5
	Супернатант	5	0,42±0,021	83,9
		10	0,40±0,020	84,6
		15	0,39±0,020	85,0
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	Культуральная жидкость	5	0,15±0,007	94,2
		10	0,29±0,014	88,8
		15	0,40±0,020	84,6
	Супернатант	5	0,45±0,022	82,8
		10	0,54±0,027	79,0

		15	0,55±0,027	79,5
Примечание. Табл. 1, 3 и 4: при определении степени деструкции нефти погрешность не превышала 5%. Культивирование штаммов ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017 осуществляли в среде с этанолом. Продолжительность эксперимента 30 сут. Начальная концентрация нефти в воде 2,6 г/л. Степень деструкции нефти в контрольном (не обработанном ПАВ) варианте 3,5%.				

Такие результаты могут свидетельствовать о том, что основным механизмом, обеспечивающим активную деструкцию нефти в воде в присутствии препаратов ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *N. vaccinii* ИМВ В-7405, является активация ими природной нефтеокисляющей микробиоты воды. В работе [6] отмечается, что биостимуляция автохтонной микробиоты загрязненных нефтью экосистем наблюдалась и после обработки их супернатантом культуральной жидкости, содержащим ПАВ.

В связи с изложенным выше на следующем этапе анализировали количественные изменения в составе микробиоты воды в течение эксперимента. Данные по анализу микробиоты воды, обработанной ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, представлены в таблице 2.

Установлено, что в воде (до загрязнения нефтью и обработки препаратами ПАВ) содержалось $3,6 \cdot 10^4$ КОЕ/мл (таблица 2). Микробиота такой воды была представлена четырьмя морфотипами колоний. Общее количество микробиоты воды к концу эксперимента увеличилось на один-два порядка в различных опытных вариантах.

В работах [7, 18, 19] отмечается, что в результате биостимуляции количество клеток автохтонных микроорганизмов даже в загрязненной нефтью почве повышалось в среднем до 10^6 – 10^7 /г почвы. Так, например, после внесения в почву ПАВ *Bacillus subtilis* О9 в концентрации 1,9–1,95 мг/кг концентрация природной нефтеокисляющей микробиоты повысилась с 10^4 (до обработки ПАВ) до 10^6 клеток/г почвы (на 30 сут) [19].

Таблица 2. Количественные изменения микробиоты загрязненной нефтью воды через 30 сут. после обработки препаратами ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241

Table 2. Quantitative changes in oil-contaminated water microbiota at 30 days after treatment with preparations of *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 surfactants

Препарат ПАВ Preparation of surfactant	Концентрация препарата ПАВ, % Concentration of surfactant preparation, %	Микробиота воды, КОЕ/мл Microbiota of water, CFU/ml
Культуральная жидкость	5	$(6,2 \pm 0,30) \cdot 10^6$
	10	$(1,1 \pm 0,05) \cdot 10^6$
	15	$(1,0 \pm 0,05) \cdot 10^6$
Супернатант	5	$(6,0 \pm 0,30) \cdot 10^5$
	10	$(1,1 \pm 0,05) \cdot 10^6$
	15	$(3,0 \pm 0,15) \cdot 10^5$
Примечание: Количество клеток в исходной воде (до внесения нефти и обработки препаратами ПАВ) составляло $(3,6 \pm 0,18) \cdot 10^4$ КОЕ/мл. Культивирование штамма ИМВ В-7241 осуществляли на		

этаноле.

Аналогичные представленным в таблице 2 закономерности по увеличению клеток природной микробиоты наблюдались после обработки загрязненной нефтью воды препаратами ПАВ *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405 как в виде культуральной жидкости, так и супернатанта. Полученные результаты свидетельствуют в пользу нашего предположения об активации микробиоты воды препаратами поверхностно-активных веществ.

Дальнейшие эксперименты показали, что при повышении концентрации нефти в воде до 4-6 г/л степень деструкции нефти в присутствии препаратов ПАВ всех исследуемых штаммов в виде культуральной жидкости (5%) снижалась незначительно (на 2-3%) по сравнению с показателями очистки воды, содержащей 2,6 г/л нефти.

Деструкция нефти в почве после обработки препаратами ПАВ

В отличие от разложения нефти в воде, при обработке загрязненной почвы препаратами ПАВ в виде культуральной жидкости степень деструкции нефти была существенно выше, чем при использовании для этой цели соответствующих супернатантов (таблица 3). Особенно четко такая закономерность прослеживалась для препаратов ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241. Однако и внесение супернатантов, содержащих ПАВ, сопровождалось достаточно высокой степенью разложения нефти (43-63%). Такие результаты могут свидетельствовать о том, что в процессе деструкции нефти в почве (в отличие от разложения нефти в воде, см. табл. 1) принимают участие как клетки исследуемых продуцентов ПАВ, так и сами поверхностно-активные вещества. Однако для окончательных выводов о механизмах деструкции нефти в почве, обработанной культуральной жидкостью штаммов IMB Ac-5015, IMB B-7241 и IMB B-7405, требуются исследования по изменению количества как клеток продуцентов ПАВ, так и природной микробиоты почвы в течение эксперимента, что будет являться предметом наших дальнейших исследований.

Таблица 3. Влияние препаратов ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405 на эффективность очистки почвы от нефти

Table 3. Effect of *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017, and *N. vaccinii* IMB B-7405 surfactants on the effectiveness of oil removal from contaminated soil

Продуцент ПАВ Producer of surfactant	Препарат ПАВ Preparation of surfactant	Концентрация препарата ПАВ, мл/кг почвы Concentration of surfactant preparation, ml/kg of soil	Концентрация остаточной нефти, г/кг Concentration of residual oil, g/kg	Степень деструкции нефти, % Degree of oil degradation, %
<i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	Культуральная жидкость	100	4,1±0,21	80,8
		200	3,9±0,19	81,8
		300	3,8±0,19	82,2
	Супернатант	100	12,2±0,61	43,0
		200	12,1±0,61	43,5
		300	12,0±0,60	43,9

<i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017	Культуральная жидкость	100	7,0±0,35	67,3
		200	5,7±0,28	73,4
		300	2,9±0,14	86,4
	Супернатант	100	11,6±0,58	45,8
		200	10,4±0,52	51,4
		300	9,3±0,46	56,5
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	Культуральная жидкость	100	6,2±0,31	71,0
		200	5,6±0,28	74,0
		300	3,5±0,17	83,5
	Супернатант	100	9,6±0,48	55,0
		200	8,3±0,41	61,2
		300	5,8±0,29	62,7
Примечание: Начальная концентрация нефти в почве 21,4 г/кг. Степень деструкции нефти в контрольном (не обработанном ПАВ) варианте 5,8%. Культивирование штаммов IMB B-7241 и IMB Ac-5017 осуществляли в среде с н-гексадеканом и обработанным подсолнечным маслом.				

Тем не менее, в работе [4] отмечается, что вариант биоаугментации, в котором в загрязненные нефтью экосистемы интродуцируются нефтеокисляющие бактерии, синтезирующие ПАВ, является более привлекательным и эффективным, чем просто внесение углеводородассимилирующих микроорганизмов. Другие исследования [7] показали, что интродукция в стерильную почву клеток *Pseudomonas putida* CB-100 сопровождалась синтезом рамнолипидов (1,79 мг/кг почвы) и разложением 24,5% углеводов, в то время как в нестерильной почве степень разложения углеводов и синтез рамнолипидов составляли 40,6% и 1,54 мг/кг соответственно. Введение в стерильную почву биомассы *P. putida* CB-100, а также источников азота и фосфора приводило к увеличению степени деструкции углеводов до 61%. При этом уровень синтеза рамнолипидов в почве составлял 1,85 мг/кг [7].

Из литературы известно, что в присутствии ПАВ *Pseudomonas alcaligenes* S22 степень разложения дизельного топлива в почве составляла 92% через 21 сут. [20]. В работе [6] сравнивали эффективность разложения нефти (3 г/кг) в почве микробными ПАВ, в частности, рамнолипидами и софоролипидами и их синтетическими аналогами – Твином 80 и Тритоном X-100. Показано, что при применении микробных ПАВ степень деструкции нефти через 7 сут составляла 23 и 14% для рамнолипидов и софоролипидов соответственно, в то время как использование синтетических аналогов позволило удалить всего 4-6% нефти. Внесение раствора рамнолипида в загрязненную почву сопровождалось удалением 91% нефти (начальная концентрация 1%) через 5 недель [4]. Таким образом, эффективность очистки почвы от нефти в присутствии исследуемых нами препаратов ПАВ не уступает описанной в литературе, а существенным преимуществом ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405 является возможность их использования в виде культуральной жидкости.

Сравнительная характеристика препаратов ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405 с коммерческим препаратом «Деворойл»

Изучение микробной деструкции нефтяных загрязнений и целенаправленная работа по селекции микроорганизмов-деструкторов углеводов нефти позволили разработать ряд препаратов на их основе [3].

На заключительном этапе мы осуществляли сравнение эффективности препарата «Деворойл», состоящего из 5 углеводородокисляющих бактерий и дрожжей, с

препаратами ПАВ штаммов ИМВ В-7241, ИМВ Ас-5017 и ИМВ В-7405 в виде культуральной жидкости. Выбор «Деворойла» среди многих других препаратов был обусловлен тем, что он является одним из первых, появившихся на рынке, а также наиболее известным и изученным. Данные, представленные в таблице 4, показывают, что при использовании препарата «Деворойл» степень деструкции нефти в воде через 28 сут. составляла 68%. Отметим, что в аналогичных условиях в присутствии препаратов ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *N. vaccinii* ИМВ В-7405 наблюдали деградацию 94-95% нефти, а количество клеток природной микробиоты воды было выше, чем после обработки «Деворойлом».

Таблица 4. Биодеструкция нефти в воде при использовании препарата «Деворойл» и культуральной жидкости (КЖ) *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *N. vaccinii* ИМВ В-7405

Table 4. Biodegradation of oil present in water using "Devoroil" preparation and liquid culture of *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017, and *N. vaccinii* ИМВ В-7405

Препарат Preparation	Экспозиция, сут Exposure, day	Концентрация остаточной нефти, г/л Concentration of residual oil, g/l	Степень деструкции нефти, % Degree of oil degradation, %	Общее количество клеток в воде, КОЕ/мл The total number of cells in water, CFU/ml
«Деворойл»	7	2,28±0,11	12	$(2,2±0,11) \cdot 10^4$
	14	1,76±0,09	32	$(7,2±0,36) \cdot 10^4$
	28	0,83±0,04	68	$(2,0±0,1) \cdot 10^5$
КЖ штамма ИМВ Ас-5017	28	0,13±0,01	95	$(3,9±0,19) \cdot 10^5$
КЖ штамма ИМВ В-7241	28	0,13±0,01	95	$(3,2±0,16) \cdot 10^5$
КЖ штамма ИМВ В-7405	28	0,16±0,01	94	$(3,0±0,15) \cdot 10^5$

Примечание: Количество клеток в исходной воде (до внесения нефти и обработки препаратами) составляло $(3,2±0,16) \cdot 10^3$ КОЕ/мл. Начальная концентрация нефти 3,0 г/л. Культивирование штаммов ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017 осуществляли на н-гексадекане.

По нашему мнению, установленная для «Деворойла» относительно низкая степень деструкции нефти может быть обусловлена недостаточным содержанием в загрязненной нефтью воде биогенных элементов, необходимых для активации нефтеокисляющей микрофлоры, входящей в состав этого препарата. Так, требуемое содержание источников азота и фосфора превышает как минимум на порядок концентрацию биогенных элементов, используемую в данной работе. Кроме того, одним из недостатков препаратов на основе биомассы является наличие в их составе микроорганизмов, неадаптированных к определенным природным условиям. При обработке загрязненных нефтью территорий препаратами микробных ПАВ в результате солиubilизации нефти происходит активация природной нефтеокисляющей микробиоты, не требующей адаптации к условиям их обитания, что существенно ускоряет процессы деструкции углеводородов.

ВЫВОДЫ

В результате проведенной работы показана высокая эффективность применения невысоких концентраций препаратов ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *N. vaccinii* ИМВ В-7405 в виде культуральной жидкости для очистки от нефти воды (2,6-6,0 г/л) и почвы (21,4 г/кг). Интенсификация деструкции нефтяных загрязнений в присутствии ПАВ обусловлена стимуляцией аборигенной микробиоты в результате солюбилизации нефти. При использовании известного препарата «Деворойл» через 28 сут. наблюдали разложение 68% нефти в воде (2,6 г/л), в то время как обработка культуральной жидкостью штаммов ИМВ В-7241, ИМВ Ас-5017 и ИМВ В-7405 в аналогичных условиях сопровождалась деструкцией 94-95% нефти.

Финансирование

Исследования выполнены в рамках проекта «Научные основы создания комплексной безотходной технологии микробных препаратов с различными биологическими свойствами», финансируемого Министерством образования и науки Украины (номер государственной регистрации 0112U007799).

ЛИТЕРАТУРА

1. Zaki M.S., Fawzi O.M., Abd EL-Zaher M.F. Bioremediation of contaminants // Life Sci. J. – 2013. – Vol. 10, №1. – P. 3329-3332.
2. Tyagi M., da Fonseca M.M., Carvalho C.C. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes // Biodegradation. – 2011. – Vol. 22, №2. – P. 231-241.
3. Рогозина Е.А., Андреева О.А., Жаркова С.И., Мартынова Д.А., Орлова Н.А. Сравнительная характеристика отечественных биопрепаратов, предлагаемых для очистки почв и грунтов от загрязнения нефтью и нефтепродуктами // Нефтегазовая геология. Теория и практика. – 2010. – Т. 5, №3.
4. Das N., Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview // Biotechnol. Res. Int. – 2011.
5. Ławniczak Ł., Marecik R., Chrzanowski Ł. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2013. – Vol. 97, №6. – P. 2327-2339.
6. Pacwa-Plociniczak M., Plaza G.A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances // Int. J. Mol. Sci. – 2011. – Vol. 12, №1. – P. 633-654.
7. Ángeles M.T., Refugio R.V. *In situ* biosurfactant production and hydrocarbon removal by *Pseudomonas putida* CB-100 in bioaugmented and biostimulated oil-contaminated soil // Brazilian J. Microbiol. – 2013. – Vol. 44, №2. – P. 595-605.
8. Pemmaraju S.C., Sharma D., Singh N., Panwar R., Cameotra S.S., Pruthi V. Production of microbial surfactants from oily sludge-contaminated soil by *Bacillus subtilis* DSVP 23 // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2012. – Vol. 167, №5. – P. 1119-1131.
9. Chrzanowski L., Ławniczak L., Czaczyk K. Why do microorganisms produce rhamnolipids? // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – Vol. 28, №2. – P. 401-419.
10. Ron E.Z., Rosenberg E. Biosurfactants and oil bioremediation // Cur. Opin. Biotechnol. – 2002. – Vol. 13, №3. – P. 249-252.
11. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Voloshina I.N., Gregirchak N.N. Use of claydite-immobilized oil-oxidizing microbial cells for purification of water from oil // Appl. Biochem. Microbiol. – 2005. – Vol. 41, №1. – P. 51-55.
12. Karpenko E.V., Vil'danova-Martysishin R.I., Shcheglova N.S., Pirog T.P., Voloshina I.N. The prospects of using bacteria of the genus *Rhodococcus* and microbial surfactants for the

degradation of oil pollutants // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2006. – Vol. 42, №2. – P. 156-159.

13. Pirog T.P., Antonuk S.I., Karpenko Y.V., Shevchuk T.A. The influence of conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 strain cultivation on surface-active substances synthesis // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2009. – 45, №3. – P. 272-278.

14. Pirog T., Sofilkanych A., Konon A., Shevchuk T., Ivanov S. Intensification of surfactants' synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 on fried oil and glycerol containing medium // *Food Bioprod. Process.* – 2013. – Vol. 91, №2. – P. 149-157.

15. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Volishina I.N., Karpenko E.V. Production of surfactants by *Rhodococcus erythropolis* strain EK-1, grown on hydrophilic and hydrophobic substrates // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2004. – Vol. 40, №5. – P. 470-475.

16. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.

17. Singh A., van Hammer J.D., Ward O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects // *Biotechnol. Adv.* – 2007. – Vol. 25, №1. – P. 99-121.

18. Embar K., Forgacs C., Sivan A. The role of indigenous bacterial and fungal soil populations in the biodegradation of crude oil in a desert soil // *Biodegradation.* – 2006. – Vol. 17, №4. – P. 369-377.

19. Cubitto M.A., Morán A.C., Commendatore M., Chiarello M.N., Baldini M.D., Siñeriz F. Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils // *Biodegradation.* – 2004. – Vol. 15, №5. – P. 281-287.

20. Kaczorek E., Moszynska S., Olszanowski A. Modification of cell surface properties of *Pseudomonas alcaligenes* S22 during hydrocarbon biodegradation // *Biodegradation.* – 2011. – Vol. 22, №2. – P. 359-366.

REFERENCES

1. Zaki M.S., Fawzi O.M., Abd EL-Zaher M.F. Bioremediation of contaminants. *Life Sci. J.*, 2013, vol. 10, no. 1, pp. 3329-3332. [http://dx. doi: 422_16108blife1001_3329_3332](http://dx.doi.org/10.4236/life.2013.10103329).

2. Tyagi M., da Fonseca M.M., Carvalho C.C. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 2011, vol. 22, no. 2. pp. 231-241. PMID: 20680666. DOI: 10.1007/s10532-010-9394-4.

3. Rogozina E.A., Andreeva O.A., Zharkova S.I., Martynova D.A. Sravnitel'naya kharakteristika otechestvennykh biopreparatov, predlagaemykh dlya ochistki pochv i gruntov ot zagryazneniya neftyu i nefteproduktami [Comparative characteristic of native biopreparations proposed for cleanup of soils and grounds from oil pollution]. *Neftegazovaya geologiya. Teoriya i praktika.* – *Petroleum geology. Theory and practice*, 2010, vol. 5, no. 3. Available at: http://www.ngtp.ru/rub/7/37_2010.pdf.

4. Das N., Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol. Res. Int.*, 2011. PMID: 21350672. DOI:10.4061/2011/941810.

5. Ławniczak Ł., Marecik R., Chrzanowski Ł. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, vol. 97, no. 6, pp. 2327-2339. DOI:10.1007/s00253-013-4740-1.

6. Pacwa-Plociniczak M., Plaza G.A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int. J. Mol. Sci.*, 2011, vol. 12, no. 1, pp. 633-654. PMID: 21340005. DOI: 10.3390/ijms12010633.

7. Ángeles M.T., Refugio R.V. *In situ* biosurfactant production and hydrocarbon removal by *Pseudomonas putida* CB-100 in bioaugmented and biostimulated oil-contaminated soil. *Brazilian J. Microbiol.*, 2013, vol. 44, no. 2, pp. 595-605. PMID: 24294259. DOI: 10.1590/S1517-83822013000200040.

8. Pemmaraju S.C., Sharma D., Singh N., Panwar R., Cameotra S.S., Pruthi V. Production of microbial surfactants from oily sludge-contaminated soil by *Bacillus subtilis* DSVP 23. *Appl.*

- Biochem. Biotechnol.*, 2012, vol. 167, no. 5, pp. 1119-1131. PMID: 22391691. DOI: 10.1007/s12010-012-9613-z.
9. Chrzanowski L., Lawniczak L., Czaczyk K. Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, vol. 28, no. 2, pp. 401-419. PMID: 22347773. DOI:10.1007/s11274-011-0854-8.
10. Ron E.Z., Rosenberg E. Biosurfactants and oil bioremediation. *Cur. Opin. Biotechnol.*, 2002, vol. 13, no 3, pp. 249-252. PMID: 12180101.
11. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Voloshina I.N., Gregirchak N.N. Use of claydite-immobilized oil-oxidizing microbial cells for purification of water from oil. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2005, vol. 41, no. 1, pp. 51-55. DOI:10.1007/s10438-005-0010-z.
12. Karpenko E.V., Vil'danova-Martshishin R.I., Shcheglova N.S., Pirog T.P., Voloshina I.N. The prospects of using bacteria of the genus *Rhodococcus* and microbial surfactants for the degradation of oil pollutants. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2006, vol. 42, no. 2, pp. 156-159. DOI:10.1134/S0003683806020074.
13. Pirog T.P., Antonuk S.I., Karpenko Y.V., Shevchuk T.A. The influence of conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 strain cultivation on surface-active substances synthesis. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2009, vol 45, no. 3, pp. 272-278. DOI:10.1134/S0003683809030065.
14. Pirog T., Sofilkanych A., Konon A., Shevchuk T., Ivanov S. Intensification of surfactants' synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 on fried oil and glycerol containing medium. *Food Bioprod. Process.*, 2013, vol. 91, no. 2, pp. 149-157. DOI:10.1016/j.fbp.2013.01.001.
15. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Voloshina I.N., Karpenko E.V. Production of surfactants by *Rhodococcus erythropolis* strain EK-1, grown on hydrophilic and hydrophobic substrates. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2004, vol. 40, no. 5, pp. 470-475. DOI:10.1023/B:ABIM.0000040670.33787.5f.
16. Lakin G.F., Biometriya [Biometry]. Moscow, Vysshaya shkola, 1990, 352 p.
17. Singh A., van Hammer J.D., Ward O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol. Adv.*, 2007, vol. 25, no. 1, pp. 99-121. PMID: 17156965.
18. Embar K., Forgacs C., Sivan A. The role of indigenous bacterial and fungal soil populations in the biodegradation of crude oil in a desert soil. *Biodegradation*, 2006, vol. 17, no. 4, pp. 369-377. PMID: 16570229.
19. Cubitto M.A., Morán A.C., Commendatore M., Chiarello M.N., Baldini M.D., Siñeriz F. Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. *Biodegradation*, 2004, vol. 15, no. 5, pp. 281-287. PMID: 15523911.
20. Kaczorek E., Moszynska S., Olszanowski A. Modification of cell surface properties of *Pseudomonas alcaligenes* S22 during hydrocarbon biodegradation. *Biodegradation*, 2011, vol. 22, no 2, pp. 359-366. PMID: 20820883. DOI: 10.1007/s10532-010-9406-4.

**ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB B-7241, RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS
IMB Ac-5017 ЖӘНЕ NOCARDIA VACCINII IMB B-7405 ҮСТІРТІН-БЕЛСЕНДІ
ЗАТТЕКТЕРДІҢ ҚАТЫСУЫМЕН МҰНАЙМЕН ЛАСТАНУЛАРДЫҢ БҰЗЫЛУЫ**

Пирог Т.П., Софилканич А.П., Гриценко Н.А.

Азық-түлік Ұлттық университеті
Владимирская к-сі, 68, Киев, 0160, Украина
tapirog@nuft.edu.ua

АБСТРАКТ

Бүгінгі күні мұнай бүкіл дүние жүзінде энергияның негізгі көзі болып табылады, бірақ сонымен бірге осы ксенобиотиктің қоршаған ортаға төгілу ықтималдығы да арта түсуде. Мұнайдың төгілулерін болдырмау үшін әдетте физикалық және механикалық әдістер пайдаланылады, алайда олар әрқашан жеткілікті деңгейде нәтижелі бола бермейді. Мұнаймен ластануларды жою үшін мұнай тотықтандырушы микроорганизмдерді (биоаугментация) тікелей енгізуге немесе табиғи (автохондық) микробиотаны (биостимуляция) ынталандыратын түрлі қосылыстарды, соның ішінде микробтық үстіртін-белсенді заттектерді пайдалануға негізделген биологиялық әдістер перспективаға ие. Экологиялық қауіпсіздіктің, суда ерімейтін қосылыстарды эмульгациялау және ксенобиотиктердің ыдырау нәтижелілігін арттыру қабілеттілігінің нәтижесінде микробтық ПАВ-тар табиғат қорғау технологияларында кеңінен қолданыла алады. Мақалада мұнайды суда және топырақта ыдыратуды күшейту үшін *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 және *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 үстіртін-белсенді заттектерді қолдану сипатталған. Құрамында үстіртін-белсенді заттектері бар өсірінділік сұйықтықпен өңдегеннен кейін мұнайдың бұзылу дәрежесі суда (2,6-6,0 г/л) және топырақта (21,4 г/кг) 30 тәуліктен кейін 80-94% құрады. *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 және *N. vaccinii* IMB B-7405 үстіртін-белсенді заттектердің қатысуымен мұнайдың суда белсенді бұзылуын қамтамасыз ететін негізгі тетік олардың табиғи мұнай тотықтандырушы микробиотаны белсендіруі болып табылатындығы болжамдалуда.

Негізгі сөздер: мұнайдың бұзылуын күшейту, микробтық үстіртін-белсенді заттектер, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 және *Nocardia vaccinii* IMB B-7405.