

# БИОПРЕПАРАТ на основе углеводородокисляющего штамма *Phyllobacterium myrsinacearum* DKS-1 для восстановления нефтезагрязненных **МОРСКИХ АКВАТОРИЙ**

**На основе углеводородокисляющего штамма *Phyllobacterium myrsinacearum* DKS-1, выделенного из шельфовых вод Северного Каспия, разработан биопрепарат «Phyloil» в жидкой и сухой форме на субстрате-носителе. Проведенные испытания биопрепарата показали эффективность его применения для очистки морской воды от нефтяных углеводородов, в том числе полициклических ароматических.**

## Введение

**В**озможность нефтяного загрязнения Каспийского моря в настоящее время приобретает особую остроту в связи с освоением углеводородных запасов в его северной части. При разработке углеводородных месторождений возникает вероятность возникновения аварийных разливов нефти, негативно влияющих на экосистемы моря. Нефтяные разливы относятся к числу наиболее сложных и динамичных явлений распределения примесей в море. Каждый разлив по-своему уникален и неповторим из-за бесконечного набора вариаций природных и антропогенных факторов в конкретном районе. Оценивая уникальность рассматриваемого бассейна и интенсификацию деятельности по поисково-разведочному и добычному бурению в российском секторе, необходима разработка способов ликвидации аварийных разливов нефти с целью минимизации последствий инцидентов, ведущих к нефтяному загрязнению компонентов окружающей среды.

Один из наиболее экологически безопасных путей решения этой проблемы – применение бактериальных препаратов, использующих углеводороды нефтепродуктов как источник

**И.Ю. Куликова\***,

кандидат  
биологических наук,  
доцент, докторант,  
Астраханский  
государственный  
технический  
университет

энергии и углерода. Наиболее эффективными являются биопрепараты на основе природных углеводородокисляющих микроорганизмов, выделенных в конкретной климатической зоне, так как микробиота, несвойственная той или иной акватории, вносимая в виде биопрепаратов, может подавляться аборигенными микробными популяциями [1]. Преимущества применения природных микроорганизмов и их сообществ связаны с их устойчивостью к действию биотических факторов, адаптированностью к условиям среды непосредственного использования.

Целью настоящей работы являлась разработка биопрепарата на основе углеводородокисляющих микроорганизмов Каспийского моря и изучение возможности его применения для восстановления нефтезагрязненных морских акваторий.

## Материалы и методы исследования

**Б**иопрепарат «Phyloil» представлен в жидкой и сухой формах и создан на основе углеводородокисляющего штамма *Phyllobacterium myrsinacearum* DKS-1, выделенного в результате проведенных микробиологических мониторинговых исследований шельфовых вод Северного Каспия в районе разведки месторождений углеводородного сырья [2]. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (коллекционный номер ВКПМ В-9079) и защищен патентом [3].

\* Адрес для корреспонденции: [kulikovairina@bk.ru](mailto:kulikovairina@bk.ru)

Получение жидкой формы биопрепарата включает получение концентрата суспензии штамма с последующим его разведением. Для получения посевного материала указанного штамма использовали жидкую питательную среду следующего состава (г/л): пептон – 10,0; сахароза – 10,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3; pH до стерилизации – 7,4, стерилизовали при 1 ати ( $121^\circ\text{C}$ ) 30 мин.

Приготовленную жидкую среду разливали в качалочные колбы объемом 750 мл по 100 мл. Среду засеивали смывом с одного скошенного агара в пробирке и колбу помещали на качалку при 220 об/мин. с температурой  $28-30^\circ\text{C}$  на 72 ч. с достижением титра  $0,5-1,0 \times 10^9$  КОЕ/мл или около  $1-2 \times 10^9$  КОЕ/мл за 96 ч. Посевной материал можно хранить в холодильнике до 1 месяца при температуре  $4-6^\circ\text{C}$ . Посевной материал вносили в биореакторы (биореактор вихревой БИОК-022, вместимостью 10 л, изготовитель ЗАО «Саяны»; биореакторы вместимостью 100 л из нержавеющей стали с мешалкой на магнитном приводе, теплообменной рубашкой, барбатером, изготовитель ОКБ ТБМ г. Кириши, Ленинградская область) и проводили глубинное культивирование в аэробных условиях при температуре  $28-30^\circ\text{C}$  с постоянно работающей мешалкой при коэффициенте заполнения сосуда 0,8 на среде следующего состава (г/л): кукурузный экстракт – 10,0; сахароза – 10,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3; pH 7,5. Полученный в биореакторах концентрат суспензии штамма разводили стерильной дистиллированной водой, в которую добавляли (г/л воды): концентрат бактериальной су-



пензии – 100,0; меласса – 20,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,5;  $\text{MgSO}_4$  – 1,5; pH 7,5.

Жидкую форму биопрепарата разливали в стерильные пластиковые бутылки или канистры емкостью от 1 до 10 л. Полученную жидкую форму биопрепарата выдерживали в течение 3-5 сут. при  $20-25^\circ\text{C}$ .

Сухая форма биопрепарата включает стерильный субстрат – носитель адсорбент вермикулитовый вспученный, в поры которого искусственно иммобилизован штамм *Phyllobacterium myrsinacearum*. Природные адсорбенты, применяемые в современных способах очистки, должны обладать высокой сорбционной емкостью. Природные алюмосиликатные адсорбенты, такие как вермикулит, перлит, цеолит и др. имеют низкую адсорбцию по отношению к нефтепродуктам, что требует модифицирования их поверхностно-структурных характеристик с целью придания им олеофильных свойств. Это достигается, например, путем термообработки алюмосиликатов. Вермикулит вспученный представляет собой сыпучий, пористый, зернистый материал чешуйчатого строения, получаемый в результате обжига природных гидратированных слюд. Обладает высокой огнестойкостью, малой плотностью, низкой теплопроводностью, химико-биологической инертностью при контакте с агрессивными средами, не смачивается расплавленным металлом, имеет высокие сорбционные свойства, экологически чистый, не токсичный, не подвержен гниению, препятствует распространению плесени, без запаха. Химический состав адсорбента вермикулитового (%):

$\text{SiO}_2$  – 34-36;  $\text{Al}_2\text{O}_3$  – 6-18;  $\text{MgO}$  – 14-25;  $\text{CaO}$  – 1,2-2;  $\text{K}_2\text{O}$  – 3-5;  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  – 5,6-17; другие – 0,2-1,2; pH ( $\text{H}_2\text{O}$ ) – 6,8-8.

Вермикулит вспученный высушивали при температуре  $80-100^\circ\text{C}$ , размалывали на молотковой мельнице до размеров 0,1–0,25 мм. Влажность субстрата носителя не должна превышать 15 %, а pH после суспендирования в воде должен составлять 7,2–7,4. Субстрат-носитель расфасовывали с наполнением 0,8 от объема в полиэтиленовые пакеты толщиной от 40 до 100 микрон размером 20 и 30 см по 150 и 400 г, пакеты запаивали и упаковывали в соответствующую тару для отправки на гамма-стерилизацию, где субстрат-носитель подвергали облучению гамма-лучами при дозе 1,0–2,0 Мегарад (10-20 килоГрей). Субстрат-носитель можно стерилизовать и термическим способом – 2 ч при  $121^\circ\text{C}$ . В этом случае в качестве упаковки используются мешки из крафт-бумаги размером 20-30 см. Концентрат бактериальной суспензии получали вышеописанным способом глубинным

культивированием на жидкой среде в ферментере.

Стерильный субстрат-носитель в пакетах инокулировали инъекцией смесью концентрата суспензии штамма, 15 % стерильного раствора мелассы и воды, взятых в соотношении 1:1:1. На каждые 150 г стерильного субстрата-носителя с влажностью 15 % использовали 50 мл жидкой смеси. Воду и раствор мелассы предварительно стерилизовали. Конечная влажность биопрепарата на носителе не должна превышать 25 %. Инъекцию производили стерильной иглой диаметром 0,5–0,7 см. Инокулированные пакеты перемешивали вручную или во вращающемся барабане – 30 об/мин. в течение 3–5 мин. Исходный титр инокулированного субстрата-носителя составляет  $20 \times 10^6$  КОЕ/г. Осуществляли дополнительное поверхностное культивирование штамма на субстрате-носителе в течение 3–5 сут. при 18–20 °С. Благодаря тому, что пакеты герметично закрыты, в них поддерживается практически постоянная влажность.

Испытания опытной партии биопрепарата «Phyloil» проводили в модельных экосистемах с имитацией аварийного разлива нефти в море. Для этого были использованы 20-литровые сосуды, содержащие 15 литров морской воды, отобранной на лицензионном участке ООО «Лукойл-Нижневожскнефть» Северного Каспия, в которые вносили 1 % (по объему) сырой каспийской нефти (что соответствовало распределению нефти по поверхности воды  $300 \text{ кг/км}^2$ ).

Первый контроль моделировал процесс естественного самоочищения за счет физико-химических процессов и деятельности аборигенной микробиоты воды. Для этого в сосуды с морской водой добавляли нефть без внесения биопрепарата.

Во втором контроле происходил процесс физико-химической адсорбции нефти. Для этого в сосуды с морской водой, загрязненной нефтью, вносили стерильный вермикулит в количестве  $30 \text{ г/м}^2$  поверхности.

Для испытания действия различных форм биопрепарата их распыляли на поверхность нефтяной пленки в соответствующих модельных сосудах. Вносимая доза составляла для сухого биопрепарата на вермикулите  $30 \text{ г/м}^2$ , жидкого –  $300 \text{ мг/м}^2$  поверхности воды.

Экспериментальные системы выдерживали при естественном освещении и свободном газообмене в течение 15 сут.

Для испытания деструкционных способностей биопрепарата «Phyloil» определяли содержание в воде суммарных нефтяных углеводородов флуориметрическим мето-

**Ключевые слова:**

нефтяное  
загрязнение,  
углеводороды,  
углеводородоокси-  
ляющий штамм,  
биопрепарат

дом, а также уровень полиароматических углеводородов [4].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета статистического анализа компьютерных программ STATISTICA V 6.0, Microsoft Office 2003 для Windows.

## Результаты и их обсуждение

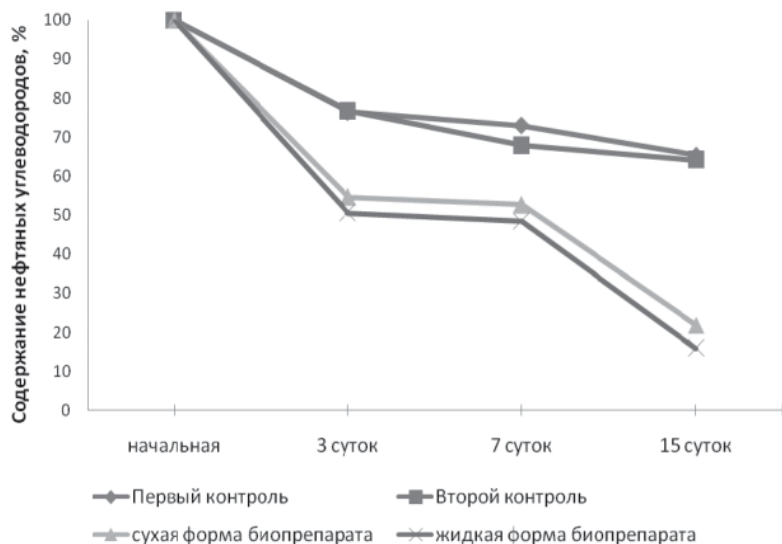
**Н**а основе штамма *Phyllobacterium myrsinacearum* DKS-1 с использованием типового биотехнологического оборудования и материалов был разработан биопрепарат, названный нами «Phyloil» и предназначенный для ликвидации аварийных разливов нефти в море.

Опытная партия биопрепарата представлена в жидкой и сухой форме на субстрате-носителе (рис. 1).

Жидкая форма биопрепарата представляет собой жидкость от светло-розового до темно-бурого цвета, включающую биомассу штамма с числом клеток не менее  $50 \times 10^6$ /мл и его метаболиты, образующиеся при куль-



Рис. 1. Биопрепарат «Phyloil» в жидкой и сухой форме.



**Рис. 2.** Убыль нефтяных углеводов в морской воде при испытании биопрепарата «Phyloil», %.

тивировании, а также остатки питательной среды. Сухая форма биопрепарата включает стерильный субстрат – носитель алюмосиликатный адсорбент вермикулитовый вспученный, в поры которого искусственно иммобилизован штамм с числом клеток не менее  $50 \times 10^6$ /мл и представляет собой сыпучую массу от светло-серого до темно-бурого цвета.

Структура вермикулита как носителя обеспечивает оптимальные условия для иммобилизации и жизнедеятельности штамма на пористой структуре. При этом значительно улучшаются условия аэрации, увеличивается площадь питания клеток, а также одновременно обеспечивается их минеральное питание. Кроме того, иммобилизация штамма на твердой поверхности предотвращает

взаимное ингибирование клеток продуктами их метаболизма.

В результате проведенных испытаний опытной партии биопрепарата «Phyloil» отмечено снижение содержания углеводов в морской воде во всех вариантах модельных экосистем (рис. 2).

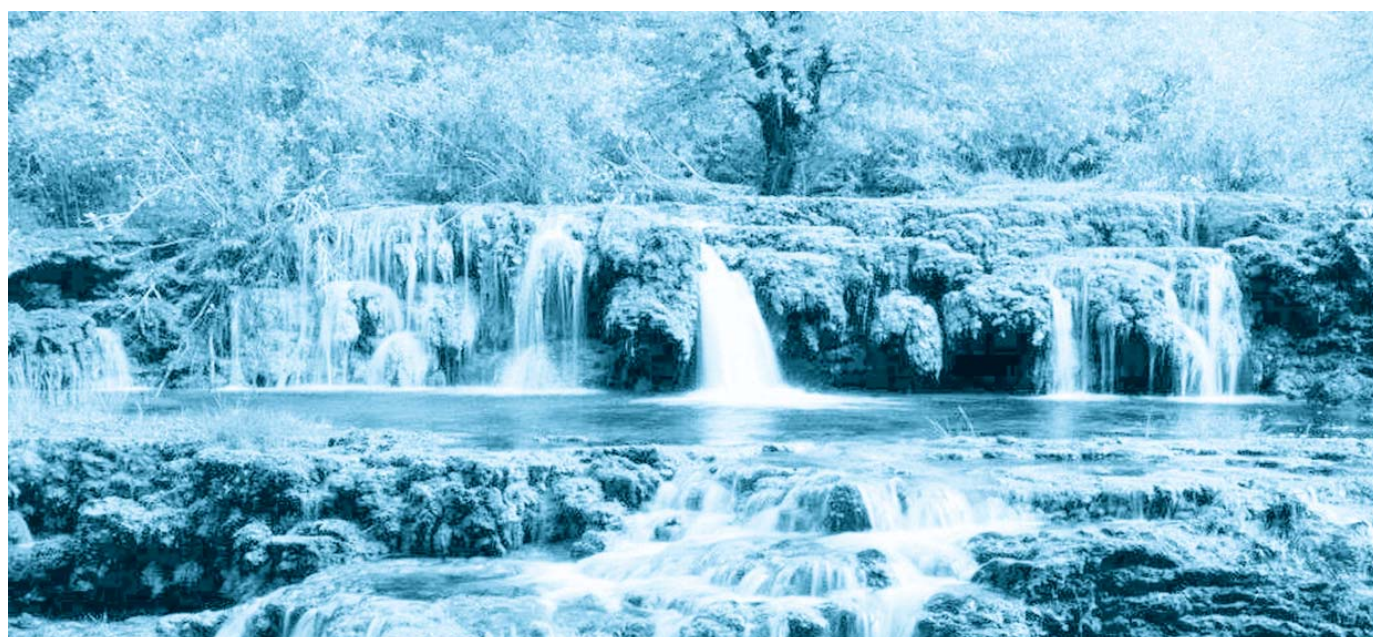
Установлено, что использование вермикулита как адсорбента лишь на 1,2 % ускорило процесс естественного самоочищения морской воды от нефтяных углеводов.

При очистке жидким биопрепаратом убыль суммарных нефтяных углеводов составила около 84 %, что почти на 50 % превышает аналогичный показатель в сравнении с контролем, где разрушение нефтяных углеводов происходит в результате процесса естественного самоочищения.

При внесении сухого биопрепарата на поверхность воды он некоторое время не тонет, адсорбирует на себе нефтяную пленку, но не насыщается при этом водой. Через 3 сут. после нанесения биопрепарата на водную поверхность, загрязненную нефтью, вокруг частиц биопрепарата образовалась бактериальная пленка, что свидетельствует о том, что он является для микроорганизмов источником питания. Через 15 сут. на поверхности воды полностью отсутствовала радужная пленка.

Установлено, что очистка сухим биопрепаратом на вермикулите снижает содержание нефтяных углеводов почти на 42 % эффективнее, чем при использовании одного лишь адсорбента. Использование этой формы биопрепарата активизирует процесс естественного самоочищения морской воды от нефтяных углеводов почти на 43 %.

Уровень суммарного содержания полиарома-



**Таблица 1**

Убыль полиароматических углеводородов (ПАУ) через 15 сут. эксперимента, %

ПАУ	контроль I	контроль II с вермикулитом	жидкий биопрепарат	сухой биопрепарат на вермикулите
<b>2-х ядерные</b>				
Нафталин	63,3±0,29	69,7±0,21	97,6±0,22	98,3±0,27
2-метилнафталин	59,6±0,29	91,3±0,21	97,5±0,28	98,1±0,27
Бифенил	17,1±0,13	58,5±0,21	68,5±0,28	74,0±0,28
Аценафтилен	28,9±0,15	46,1±0,29	54,0±0,28	59,4±0,28
Аценафтен	11,8±0,22	26,2±0,21	71,0±0,28	40,8±0,30
Флуорен	13,3±0,21	52,6±0,29	55,6±0,28	55,1±0,27
<b>3-х ядерные</b>				
Фенантрэн	26,0±0,21	27,6±0,22	37,3±0,21	49,1±0,27
Антрацен	22,4±0,21	38,4±0,21	47,2±0,29	42,3±0,21
<b>4-х ядерные</b>				
Флуорантен	26,9±0,34	52,0±0,21	60,0±0,28	59,4±0,28
пирен	27,8±0,21	55,9±0,25	57,5±0,28	71,8±0,23
Хризен	19,1±0,29	50,8±0,22	52,4±0,29	69,0±0,21
Бенз(а)антрацен	20,3±0,34	53,2±0,19	53,6±0,29	75,2±0,21
<b>5-ти ядерные</b>				
Бенз(а)пирен	7,3±0,21	15,7±0,22	56,0±0,28	35,6±0,22
Дибенз(а,h)антрацен	42,0±0,29	48,2±0,21	64,5±0,28	58,9±0,24
Сумма	41,5±0,28	62,8±0,30	75,2±0,27	76,9±0,24

тических углеводородов (ПАУ), являющихся наиболее токсичными компонентами нефти [5], в начале эксперимента составлял 260,2 мкг/л. Анализ суммарного и индивидуального состава ПАУ показал, что в ходе экспериментальных исследований произошло снижение их содержания (табл. 1).

Применение вермикулита как адсорбента интенсифицировало процесс естественного самоочищения от ПАУ почти на 21 %. При использовании разных форм биопрепарата «Phyloil» наблюдали более активный процесс деградции ПАУ. Применение жидкого биопрепарата интенсифицировало процесс естественного самоочищения от полиароматических углеводородов на 34 %, сухого биопрепарата на вермикулите – на 35 %.

Установлено, что легче подвержены деструкции бициклические ароматические углеводороды нафталин и 2-метилнафталин как в контрольных вариантах, так и в модельных системах, где испытывалось действие разных форм биопрепарата. Это подтверждает мнение о том, что с увеличением числа колец в молекуле и молекулярной массы снижается доступность углеводородов для биодеградции [6].

## Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что биопрепарат «Phyloil» эффективно и сравнительно быстро осуществляет деструкцию нефтяных углеводородов, в том числе полициклических ароматических, являющихся наиболее токсичными компонентами нефти.

Известные биопрепараты, предназначенные для очистки окружающей среды от нефтяного загрязнения, имеют определенные недостатки. В основном, они представлены в сухой форме в виде биомассы микроорганизмов, обезвоженной с использованием лиофильной или термовакuumной сушки, что приводит к увеличению себестоимости препарата и снижению выживаемости клеток при сушке. Известен бактериальный препарат «Путидойл», недостатком которого является сложная технология его приготовления, которая предусматривает распылительную сушку живой культуры бактерий. Существуют публикации, указывающие на то, что в природных условиях этот препарат малоэффективен и он оказывает угнетающее воздействие на естественный микробный ценоз [7].

Биопрепараты «Путидойл», «Эколан», «Биоприн» (олеворин) способны окислять углеводороды только в пресной воде. Недостатком препарата «Нафтокс» [8] является то, что бактерии препарата утилизируют только нормальные парафины нефти (C<sub>12</sub>–C<sub>18</sub>), а это 10-20 % нефти, в состав которой входят углеводороды, более токсичные для живой природы. При применении биопрепарата «Экобел» скорость разрушения нефти достаточно низкая (при концентрации нефти в воде от 1 до 10 % убыль составляет 87 и 61,2 % за 60 сут. В состав большинства биопрепаратов («Деворойл», «Эконадин», «Микрозим», «Сойлекс» и др.) входят дополнительные добавки и различные биостимуляторы, что приводит не только к увеличению их себестоимости, но и к процессу эвтрофикации водоемов вследствие значительного увеличения биомассы микроорганизмов.

Достоинствами разработанного биопрепарата «Phyloil» являются не только его эффективность, но и отсутствие вышеуказанных недостатков, присущих известным биопрепаратам, что позволяет рекомендовать его для восстановления нефтезагрязненных морских акваторий.

#### Литература

1. Андреева И.С. Психроотолерантные штаммы–нефтедеструкторы для биоремедиации почв и водной среды / И.С. Андреева, Е.К. Емельянова, С.Н. Загребельный, С.Е. Олькин, И.К. Резникова, В.Е. Репин // Биотехнология. 2006. № 1. С. 43 – 52
2. Куликова И.Ю. Микроорганизмы в процессе самоочищения шельфовых вод Север-

ного Каспия от нефтяного загрязнения: Автореф. дис. канд. биол. наук. Москва: МГУ. 2004. 24 с.

3. Пат. 2268934 РФ. Штамм *Phyllobacterium myrsinacearum* DKS-1 для деструкции нефтяных углеводородов солоноватоводных экосистем. /Держинская И.С., Куликова И.Ю., Сопрунова О.Б.// Заявлено 28.10.03. Опубликовано 27.01.06. Бюл. № 3.

4. Сборник методических указаний. Измерение массовой концентрации химических веществ люминесцентными методами в объектах окружающей среды. М.: Информационно-издательский центр Минздрава России. 1997. 256 с.

5. Квасников Е.И. Микроорганизмы – деструкторы нефти в водных бассейнах / Е.И. Квасников, Т.М. Ключникова. Киев.: Наукова. Думка, 1981. 131 с.

6. Foght J.M. Mineralization of [14C] hexadecane and [14C] phenantrene in crude oil: specificity among bacterial isolates / Foght J.M., Fedorak P.M., Westlake D.W.S. // Can. J. Microbiol. 1990. V. 36, N 3. P. 169-175

7. Новиков Ю.В. Исследования бактериального препарата «Путидойл», предложенного для очистки водоемов от нефти / Ю.В. Новиков, В.В. Комзолова // Водное хозяйство. 1992. № 2. С. 121 – 123

8. Пат. 2053206 РФ. Биопрепарат для очистки почвы и воды от нефти и нефтепродуктов/ Всероссийский нефтяной научно-исследовательский геологоразведочный институт// Заявлено 29.09.1994. Опубликовано 27.01.1996



I.Yu. Kulikova

## BIOAGENT BASED ON HYDROCARBON-OXIDIZING STRAIN *Phyllobacterium myrsinacearum* DKS-1 FOR OIL POLLUTED AREAS PURIFICATION

On the basis of hydrocarbon-oxidizing strain *Phyllobacterium myrsinacearum* DKS-1 isolated from shelf waters of the Caspian Sea, bioagent «Phyloil» has been developed both in liquid and dry forms on substrate

bearer. Bioagent tests has shown efficiency of its application for sea water purification from oil hydrocarbons including polycyclic aromatic hydrocarbons.

**Key words:** Oil pollution, hydrocarbons, hydrocarbon-oxidizing strain, bioagent

