

УДК 631.46

М. В. Трефилова, А. Г. Лазыкин

ОТРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНОЙ АССОЦИАЦИИ ДЛЯ ОЧИСТКИ ПОЧВ ОТ НЕФТЕПРОДУКТОВ

Рассмотрена актуальная экологическая проблема загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами. Объектом изучения явилась растительно-микробная ассоциация бактерий штамма нефтедеструктора *Pseudomonas delhiensis* КТ-13 и клубеньковых бактерий *Rhizobium lotus* RL-5. В качестве сорбентов микроорганизмов использовали семена бобового растения Лядвенца рогатого и делигнифицированный древесный опил.

Описаны основные этапы получения биопрепарата: подготовка посевного материала, проведение глубинного культивирования микроорганизмов в автоклавируемом биореакторе типа *LiFlus GX* производства *Bio-Tron Inc*, концентрирование микробных клеток с помощью модульной ультра- и микрофльтрационной системы «Сартокон - мини», процесс иммобилизации на варианты комбинаций сорбентов суспензий из клеток бактерий и стабилизирующей среды, высушивание и определение количества микроорганизмов смывом с сорбентов и высевом на плотные питательные среды. По результатам исследования образцы вносили в кюветы с почвой, загрязненной дизельным топливом (10 мл/кг). После 14 суток количество нефтепродукта снизилось на (40-45) % от исходных значений. Размеры и количество ростков, выросших на загрязненной почве, были близкие к таковым в кюветах без нефтепродукта.

Ключевые слова: биоремедиация, биопрепарат, нефть и нефтепродукты, фиторемедиация.

В последние годы в связи со значительным увеличением добычи нефти и производства нефтепродуктов усиленно возрастают масштабы нефтяного загрязнения окружающей среды. В таких условиях естественное самовосстановление почвы может длиться до 30 лет и выше [1]. Поэтому

внесение нефтеокисляющих микроорганизмов в виде биопрепарата повышает эффективность процесса биоремедиации [2].

Новым и перспективным направлением очистки почвы от нефти и нефтепродуктов является фиторемедиация. Использование растений устойчивых к токсикантам с экологической точки зрения наиболее безопасно. Исследование растений на их устойчивость к углеводородам нефти необходимо для возможности их выращивания на загрязненных почвах и восстановления нарушенного почвенного плодородия.

Сформированная в биопрепарате конструкция из нефтедеструктора и клубеньковых бактерий стимулирует рост растения, защищает его от фитопатогенов и позволяет эффективно деградировать углеводороды нефти до полного восстановления почвы.

Целью исследования является отработка способа получения биопрепарата на основе растительно-микробной ассоциации и оценка возможности его применения для восстановления загрязненной нефтепродуктами почв.

В качестве объекта научного исследования была выбрана растительно-микробная ассоциация на основе иммобилизированных на семенах бобового растения Лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus*) сорта «Солнышко» нефтеокисляющих бактерий штамма *Pseudomonas delhiensis* КТ-13 ВКПМ В-11400 и штамма клубеньковых бактерий *Rhizobium lotus* RL-5. Штамм *Pseudomonas delhiensis* КТ-13 выделен и депонирован в 2016 году сотрудниками Вятского государственного университета. Бактерии рода *Rhizobium* выделены из естественной среды территории Кировской области сотрудниками НИИСХ Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого и переданы в лабораторию кафедры Микробиологии Вятского государственного университета для их дальнейшего изучения [3, 4]. В качестве дополнительного сорбента микроорганизмов в составе биопрепарата использовали делигнифицированный древесный опил [4].

Для культивирования штамма *Pseudomonas delhiensis* КТ-13 применяли мясо-пептонный агар и жидкую питательную среду на основе кислотного

гидролизата казеина и дрожжевого автолизата (КГКДА). Культивирование клубеньковых бактерий проводили на маннитно-дрожжевом агаре (МДА) [3].

Посевной материал готовили непосредственно перед глубинным культивированием из чистой обновленной на агаризованной среде исходной культуры клеток с последующим выращиванием на жидкой питательной среде в шейкере.

Глубинную ферментацию микроорганизмов проводили в лаборатории экспериментальной биотехнологии кафедры микробиологии ВятГУ в ферментере – автоклавируемом биореакторе типа *LiFlus GX* производства *Bio-Tron Inc* в течение 24 ч для *Pseudomonas delhiensis* КТ-13 и в течение 48 ч для клубеньковых бактерий.

Режим культивирования штамма *Pseudomonas delhiensis* КТ-13 был следующий: питательная среда КГКДА; температура 28 °С; скорость перемешивания 450 об/мин; кислотность среды – рН 7,0-7,4 (поддерживали автоматическим добавлением в среду 12% раствора аммиака); аэрация воздухом – 3 л/мин в первые 4 ч роста, а затем – 6 л/мин. В качестве ростстимулирующей добавки вносили в биореактор через 4 ч после начала культивирования салицилат натрия [4].

Режим культивирования штамма *Rhizobium lotus* RL-5: питательная среда МДА; температура 28 °С; скорость перемешивания 450 об/мин; кислотность среды (рН) 6,8 – 7,2 (поддерживали автоматическим добавлением в среду 12% раствора аммиака); аэрация воздухом – 3 л/мин.

По окончании глубинной ферментации обоих штаммов количество микробной массы *Pseudomonas delhiensis* КТ-13 с биореактора объемом 3 литра составило 14,90 млрд.ж.м.кл/мл, тогда как микробных клеток клубеньковых бактерий с аналогичного объема – 13,70 млрд.ж.м.кл/мл.

Для получения целевого продукта микробные клетки отделяли от питательной среды с помощью модульной ультра- и микрофльтрационной системы «Сартокон – мини». Параметры концентрирования были следующие:

давление на входе в установку ($P_{вх}$) составляло 3,1 bar, на выходе ($P_{вых}$) – 2,5 bar, скорость потока (v) соответствовало значению 3,6 л/ч.

Результаты концентрирования представлены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика микробных концентратов штаммов

Rhizobium lotus RL-5 и *Pseudomonas delhiensis* В-11400 ($\bar{X} \pm I_{95}$, n = 3)

Наименование штамма	Количество клеток микроорганизмов, определенное ..., (млрд.м.кл/мл)	
	стандартом мутности	посевом на агаризованную среду
<i>Rhizobium lotus</i> RL-5	63,48±2,50	44,31±1,20
<i>Pseudomonas delhiensis</i> КТ-13 ВКПМ В-11400	65,80±2,62	48,30±1,21

Концентрированные суспензии клеток нефтедеструктора и ризобий высушивали в сахарозо-желатиновой среде, состоящей из 10% сахарозы и 1% желатина, которая обеспечивала защиту клеток при высушивании.

При разработке биопрепарата в качестве дополнительного носителя был выбран материал естественного происхождения – опил. Материал является доступным, биоразлагаемым и при попадании в окружающую среду не привносит с собой дополнительного экологического прессинга [5].

Как сорбент, опил обладает высокой поглотительной способностью [6]. Делигнифицированный опил не обладает повышенной кислотностью, тогда как необработанный - при попадании в почву способен спонтанно окисляться до рН 3,0 – 3,5.

Удаление лигнина из опила проводится так же с целью увеличения его гидрофильности за счет повышения числа гидроксильных групп [7].

Делигнификацию проводили путем 4-х часового кипячения в 0,1 М растворе NaOH с последующим отмыванием дистиллированной водой до значения рН равного 6,0-7,0 ед. [8].

К природным сорбентам можно отнести семена растений – фиторемедиантов, являющихся важным звеном в процессах восстановления почвенного покрова, загрязненного в результате техногенных аварий [9].

При конструировании биопрепарата было выбрано 3 варианта комбинации сорбентов:

№ 1 – семена Лядвенца рогатого;

№ 2 – семена Лядвенца рогатого: делигнифицированный опил (1:1);

№ 3 – семена Лядвенца рогатого: делигнифицированный опил (4:1).

Все варианты применяли для иммобилизации на них подготовленной суспензии из клеток микроорганизмов и стабилизирующей среды.

После иммобилизации проводили высушивание полуфабриката биопрепарата в защитной среде и определяли количество микроорганизмов смывом с сорбентов и высевом на плотные питательные среды.

Результаты подсчетов представлены в таблице 2.

Таблица 2

Количество клеток бактерий штаммов *Rhizobium lotus* RL-5 и *Pseudomonas delhiensis* КТ-13 ВКПМ В-11400 в биопрепарате ($\bar{X} \pm I_{95}$, n = 3)

№ варианта	Содержание жизнеспособных клеток штамма..., млрд.ж.м.кл/г	
	<i>Rhizobium lotus</i> RL-5	<i>Pseudomonas delhiensis</i> КТ-13 ВКПМ В-11400
1	4,02 ± 0,20	7,91 ± 0,40
2	8,73 ± 0,50	19,43 ± 1,80
3	7,62 ± 0,32	17, 10 ± 1,61

По результатам исследования наибольшее количество микроорганизмов прикрепились к сорбентам по варианту № 2 и № 3. Биопрепараты по данным вариантам вносили в кюветы с почвой, предварительно загрязненной модельным нефтепродуктом – дизельным топливом до конечной концентрации 10 мл/кг. После экспозиции в течение 14 суток установлено, что количество

нефтепродукта в обоих вариантах снизилось на (40-45)% от исходных значений. Размеры и количество ростков Лядвенца рогатого, выросших на загрязненной почве, были близкие к таковым результатам, полученным на почве без нефтепродукта.

Таким образом, в ходе исследования отработан способ получения биопрепарата на основе растительно-микробной ассоциации штаммов нефтедеструктора *Pseudomonas delhiensis* КТ-13 ВКПМ В-11400 и клубеньковых бактерий *Rhizobium lotus* RL-5, иммобилизированных на сорбенте из семян растения Лядвенца рогатого и делигнифицированного опила и высушенных в защитной среде. Кроме того, определено, что семена бобового растения Лядвенца рогатого (*Lotus corniculatus*) являются эффективным сорбентом для микроорганизмов – биодеструкторов и в составе биопрепарата эффективно участвуют в биоремедиации загрязненной дизельным топливом почвы.

Список литературы

1. Кардакова Т. С. Разработка экспериментального биопрепарата на основе нефтеокисляющих микроорганизмов, предназначенного для биоремедиации загрязненных нефтепродуктами почв Нечерноземной зоны России : отчет по науч.-исслед. работе. Киров : ВГУ, 2012.
2. Рогозина Е. А. Актуальные вопросы проблемы очистки нефтезагрязненных почв // Нефтегазовая геология. Теория и практика. 2006. № 1. С. 1–11.
3. Коновалова Е. А. Оценка возможности создания биопрепарата на основе штамма *Pseudomonas delhiensis* В-11400 – деструктора углеводородов нефти: дипл. работа / ВятГУ, Киров, 2014.
4. Гаврилов К. Е., Кардакова Т. С., Лазыкин А. Г., Коновалова Е. А., Дармов И. В. Штамм бактерий *Pseudomonas delhiensis* КТ-13 ВКПМ В-11400 – деструктор нефти и нефтепродуктов // Патент России № 2575063. 2016.
5. Филина Н. А. Исследование сорбционных свойств древесных отходов для сбора нефтепродуктов с последующей утилизацией их в виде топливных брикетов: автореф. дис. / Йошкар-Ола, 2011.

6. Куюкина М. С., Ившина И. Б., Серебренникова М. К. Оптимизация процесса иммобилизации клеток алканотрофных родококков на хвойных опилках в условиях колоночного биореактора // Вестник Пермского Университета. 2010. Вып. 1. С. 69–72.

7. Рогозина Е. А., Тимергазина И. Ф., Моргунов П. А. Очистка нефтезагрязненных почв бактериями рода *Pseudomonas* – основой биопрепаратов НАФТОКС 12-Р и НАФТОКС 48-У // Нефтегазовая геология. Теория и практика. 2014. Т. 9. № 2. С. 1–18.

8. Ефременко Е. Н., Сироткина М. С., Лягин И. В. Способ ферментативного гидролиза фосфоорганических соединений в почвогрунте // Патент России № 24510772011. 2012.

9. Киреева Н. А., Водопьянов В. В. Мониторинг растений, используемых для фиторемедиации нефтезагрязненных почв // Экология и промышленность России. 2007. Сентябрь. С. 46–47.

ТРЕФИЛОВА Мария Владимировна – магистрант, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: trefilova-m-93@mail.ru

ЛАЗЫКИН Алексей Геннадьевич – кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: alexlazykin66@gmail.ru