

УДК 579.66

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЛОКУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЭКЗОПОЛИМЕРОВ МИКРООРГАНИЗМОВ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ БИОЦЕНОЗОВ

Шараева А.А., Мефтахов Р.М., Петухова Н.И., Зорин В.В.
ФБГОУ ВПО Уфимский государственный нефтяной технический университет
e-mail: metilorang89@mail.ru

Аннотация. В результате исследования свойств 27 культур микроорганизмов, выделенных из почвенных образцов, загрязненных нефтью, найдены 3 новых перспективных продуцента биофлокулянтов. Обнаружено, что при культивировании продуцентов биофлокулянтов на среде с нефтью образуются крупные нефтяные агрегаты различной структуры. Показано, что перспективным источником углерода для получения экзополимеров может служить глицерин – отход производства биодизеля. Изучено влияние кислотности среды, температуры и концентрации биофлокулянтов на скорость осаждения каолина. Установлено, что экзополимеры, синтезированные с помощью найденных микроорганизмов, проявляют высокую флокулирующую активность в широком диапазоне кислотности среды (рН 2-11), которая при оптимальных значениях рН достигает 85-95%. Оптимальная концентрация экзополимеров составляет 50-400 мг/мл. Показана возможность использования экзополимеров для фракционирования молочной сыворотки.

Ключевые слова: биофлокулянты, нефть, микроорганизмы, *Rhodococcus*, внеклеточные полимеры

Наиболее перспективным из способов, успешно применяемых для очистки сточных вод, считается сорбционная очистка с помощью биофлокулянтов [1].

Известно, что внеклеточные полимеры микроорганизмов могут обладать флокулирующей активностью [2, 3]. При этом некоторые из биофлокулянтов, в частности производные глюкуроновой кислоты, могут составить конкуренцию широко применяемому в настоящее время в нефтедобывающей промышленности полиакриламиду и его производным, которые обладают нейротоксичным и карциногенным действием на живые организмы [4]. Однако, для создания эффективных коммерческих препаратов биофлокулянтов необходимы высокоактивные продуценты, способные синтезировать эти соединения на дешевых средах.

В настоящей работе осуществлен поиск микроорганизмов, способных синтезировать флокулянты на среде, содержащей в качестве основного ростового субстрата глицерин.

Поиск продуцентов эффективных флокулянтов осуществляли среди бактериальных культур (27 изолятов), выделенных из нефтезагрязненных образцов почвы и воды, поскольку известно, что экзополимеры играют важную роль в окислении нефти микроорганизмами, обеспечивая контакт микробных клеток с гидрофобным субстратом, а также их защиту от действия токсичных соединений [5].

При первичном скрининге продуцентов флокулянтов были получены препараты культуральной жидкости трехсуточных культур микроорганизмов, выращенных при 30 °С на нефтесодержащей среде НС (нефть - 10 г/л, хлорид аммония - 2,5 г/л, хлорид кальция двухводный - 0,01 г/л, хлорид кальция 4-водный - 0,02 г/л, сульфат магния 7-водный - 0,2 г/л, сульфат железа 7-водный - 0,01 г/л, хлорид натрия - 5,0 г/л, гидрофосфат натрия - 10,0 г/л, дигидрофосфат калия - 1,0 г/л, дрожжевой экстракт - 3,0 г/л), и исследована их флокулирующая активность. Флокулирующую активность препаратов определяли по модифицированному методу Курана [6], в котором в качестве твердой фазы использовали каолин (10 г/л). Препараты культуральной жидкости вносили в суспензию каолина (рН 7,2; 25 °С), содержащую 600 мг/л CaCl₂, в соотношении 1:30, перемешивали и определяли мутность раствора через 30 минут отстаивания на спектрофотометре СФ-26 при 550 нм. В качестве контроля использовали суспензию каолина без препарата. Флокулирующую активность препарата рассчитывали по формуле:

$$ФА = \frac{ОД_{контроля} - ОД_{пробы}}{ОД_{контроля}} \cdot 100\% ,$$

где ФА – флокулирующая активность; $ОД_{контроля}$ – оптическая плотность, измеренная для контрольной пробы; $ОД_{пробы}$ – оптическая плотность, измеренная для анализируемой пробы.

В результате исследования было обнаружено, что более половины изолятов, выделенных из нефтезагрязненных почв, синтезируют флокулянты при росте на среде НС (рисунок 1). При этом наиболее эффективные изоляты, чьи культуральные жидкости флокулируют каолин с активностью более 60%, составляют около 15% от общего числа протестированных культур.



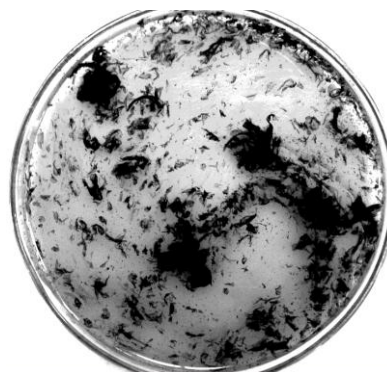
Рисунок 1. Распределение микроорганизмов, выделенных из различных образцов почвы, загрязненных нефтью, в соответствии с флокулирующей активностью их культуральных жидкостей, полученных на среде НС

Наиболее эффективными оказались культуральные жидкости культур 1-1ж, ВХ-1, 1-4ДА, АН-2ор, для которых коэффициент флокуляции составил 67, 88, 93 и 95%, соответственно.

Обнаружено, что в процессе культивирования этих микроорганизмов на среде НС с нефтью образуются крупные нефтяные агрегаты различной структуры, всплывающие к поверхности воды (рисунок 2).



а



б

Рисунок 2. Фотографии трехсуточных культур ВХ-1 (а) и АН-2ор (б) при росте на среде МС с нефтью (увеличение в 2,5 раза)

Ранее образование подобных агрегатов при росте на среде НС были выявлены при культивировании *S*-диссоцианта актинобактерий *Rhodococcus sp.* 77-32,

способного продуцировать экзополимер [7]. При этом установлено, что его морфологический антипод (*R*-диссоциант), неспособный синтезировать внеклеточный полимер, не может агрегировать нефть в тех же условиях. Внесение экзополимера, полученного с помощью *S*-диссоцианта, в среду НС, на которой растет *R*-диссоциант, приводит к образованию нефтяных агрегатов, что доказывает участие экзополимера в агрегации нефти [7].

Изучение процесса осаждения каолина в присутствии трехсуточной биомассы *S*-диссоцианта *Rhodococcus sp.* 77-32, выращенной при 30°C на среде РГА (питательный агар на основе панкреатического гидролизата кильки – 35 г/л и глицерин – 20 г/л), на которой происходит эффективный синтез экзополимера [7, 8], выявило, что она в концентрации 500 мг/л проявляет флокулирующую активность на уровне 72 % (рисунок 3). Препараты биомассы культур АН-2ор, 1-1ж, ВХ-1, 1-4ДА, полученные и протестированные в тех же условиях, что и биомасса *Rhodococcus sp.* 77-32S, также показали высокую флокулирующую активность (65 – 75%).

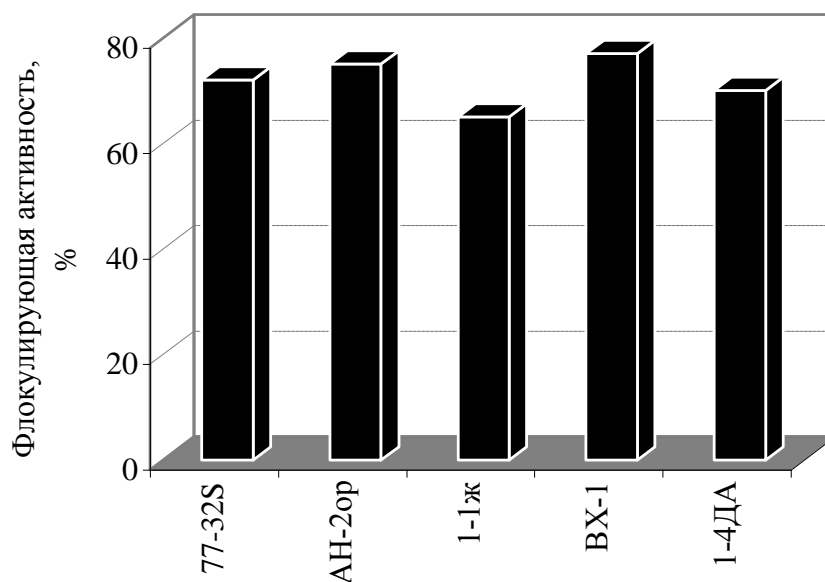


Рисунок 3. Флокулирующая активность трехсуточной биомассы микроорганизмов, полученной на среде РГА (500 мг/л), в процессе осаждения частиц суспензии каолина (10 г/л, рН 7,2) при 25°C в присутствии хлорида кальция (600 мг/л)

В результате водной экстракции из биомассы микроорганизмов АН-2ор, 1-1ж, ВХ-1 и 1-4ДА были экстрагированы водорастворимые полимеры, которые затем, как и в случае экзополимера *S*-диссоцианта *Rhodococcus sp.* 77-32 [7], были выделены из экстракта осаждением с помощью этанола (1:3).

Исследование динамики осаждения частиц глины в присутствии 200 мг/л экзополимеров исследуемых культур показало, что они обладают флокулирующей

щим действием: уже за 30 минут осаждается более 85 % каолина, в то время как в контрольном варианте за тот же период времени выпадает в осадок не более 10% глины (рисунок 4). При более продолжительном отстаивании суспензии с флокулянтами (120 мин) достигается осветление суспензии на 90-97 %.

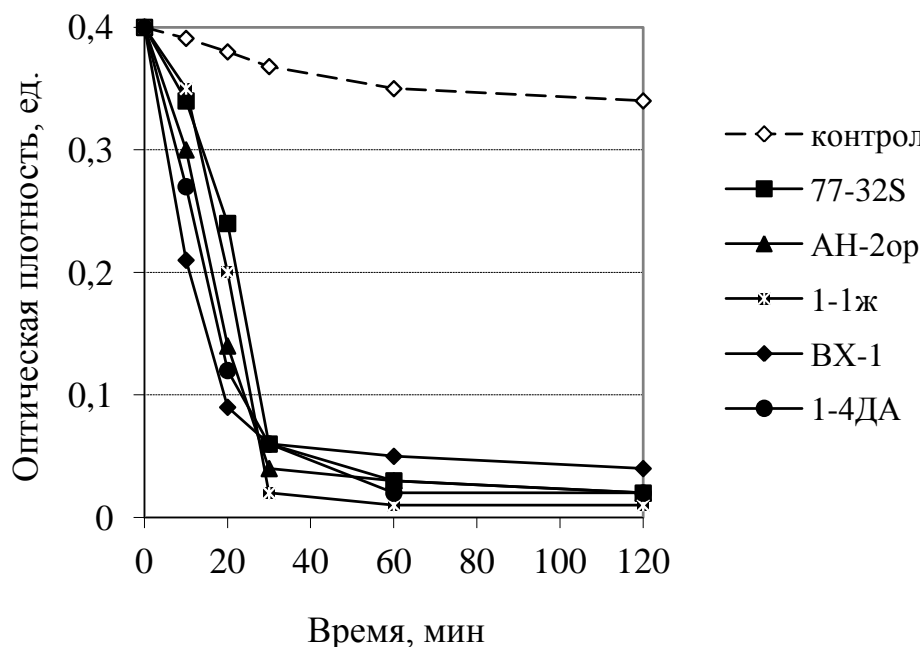


Рисунок 4. Влияние биополимеров (200 мг/л) на динамику осаждения частиц суспензии каолина (10 г/л, рН 7,2) при 25°С в присутствии хлорида кальция (600 мг/л)

Известно, что один и тот же полимер при низких концентрациях может служить флокулянтом, а при высоких концентрациях, напротив, стабилизатором дисперсной системы [4]. Для применения в промышленных масштабах экономически целесообразно использовать флокулянты в минимальных концентрациях. Установлено, что минимальные дозы исследуемых экзополимеров, в которых они проявляют наибольшую флокулирующую активность, соответствует оптимальным концентрациям наиболее эффективных биофлокулянтов, синтезируемых микроорганизмами (1 – 400 мг/л) [9-11]. В случае экзополимеров культур 1-1Ж, 1-4ДА происходит осаждение каолина на 90% в течение 30 мин уже при концентрации 50 мг/л (рисунок 5). Флокулянты, синтезированные с помощью бактерий АН-2ор и ВХ-1, максимально активно флокулируют каолин при концентрации 100 мг/л, а эффективная доза биополимера *S*-диссоцианта *Rhodococcus sp.* 77-32 составляет около 400 мг/л.

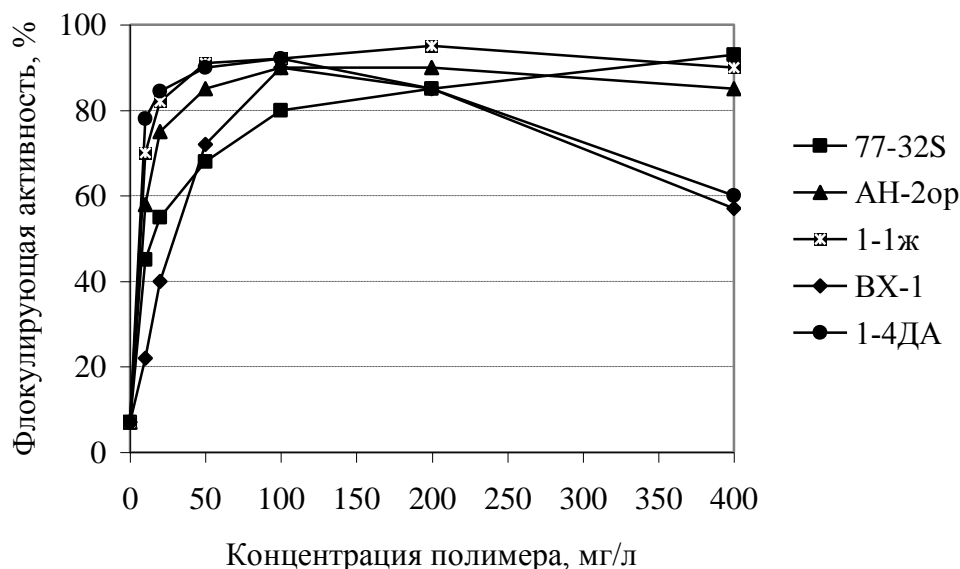


Рисунок 5. Влияние концентрации биополимеров на их флокулирующую активность при осаждении частиц суспензии каолина (10 г/л, рН 7,2) при 25°С в присутствии хлорида кальция (600 мг/л) в течение 30 мин

На скорость флокуляции диспергированных частиц с помощью биофлокулянтов существенное влияние может оказывать температура и рН среды, поскольку биополимеры при высоких температурах, а также в сильнокислых или сильнощелочных средах могут быть лабильными [12]. В этом аспекте обнаружено, что все исследованные биофлокулянты в концентрации 200 мг/л проявляют высокую активность (более 60%) в широком диапазоне кислотности среды (рисунок 6). При оптимальных значениях рН флокулирующая активность полимеров достигает 85 – 95 %. При этом оптимальные значения рН для полимеров культур 1-1Ж, ВХ-1 и 1-4ДА находятся в нейтральной и слабокислой области (рН 5 - 7,2). Полимер *S*-диссоцианта *Rhodococcus sp.* 77-32 наиболее эффективен в кислой области (рН 2 - 5), тогда как флокулянт культуры АН-2ор более активен при рН 5 - 11, что делает возможным их применение в экстремально кислых и щелочных условиях, соответственно.

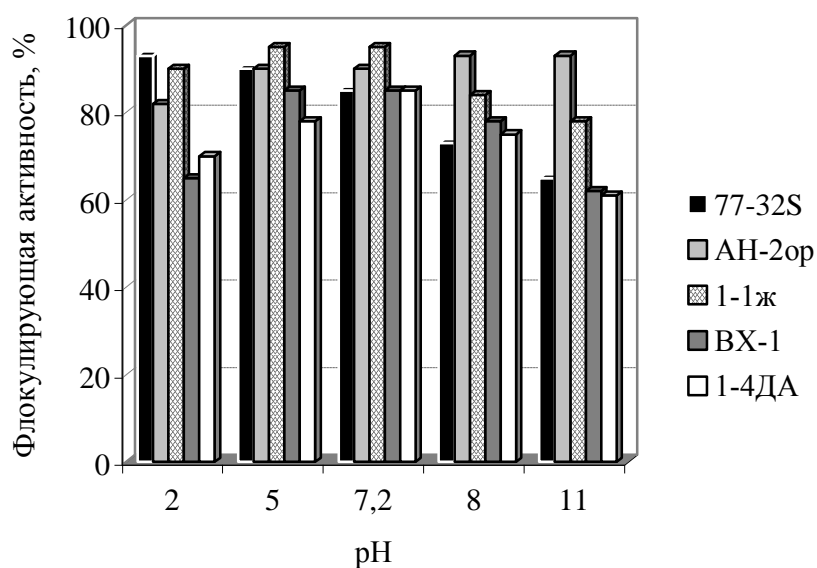


Рисунок 6. Влияние кислотности среды на флокулирующую активность биополимеров (200 мг/л) при осаждении частиц суспензии каолина (10 г/л) при 25°C в присутствии хлорида кальция (600 мг/л) в течение 30 мин

Установлено, что увеличение температуры с 25 до 60 °С не снижает флокулирующую активность исследованных экзополимеров в процессе осаждения каолина.

Полученные результаты показывают, что найденные биофлокулянты и их продуценты могут представлять интерес для решения различных актуальных задач. В частности, они могут быть использованы для разработки методов очистки сточных вод от различных взвесей. На их основе могут быть созданы экологически безопасные эффективные сорбенты с высокой флотационной способностью для сбора нефтяных пленок с поверхности водоемов. Кроме того, было обнаружено, что синтезированные биофлокулянты могут быть использованы для переработки молочной сыворотки, объемы которой в связи с увеличением производства творога, творожных изделий и сыров значительно возросли в последнее время. Это приводит к значительному снижению эффективности производства и загрязнению окружающей среды [13]. Вместе с тем в молочной сыворотке содержатся наиболее ценные компоненты (иммуноглобулины), способствующие развитию защитных функций в организме человека [14]. Обнаружено, что добавление исследуемых экзополимеров в молочную сыворотку в концентрации 200 мг/л вызывает агрегацию и флотацию, содержащихся в ней белков (рисунок 7). При этом наиболее эффективно протекает осветление сыворотки в присутствии биополимера *Rhodococcus sp.* 77-32. Установлено, что снижение кислотности до оптималь-

ного значения рН 2 увеличивает степень осветления сыворотки при 25 °С в течение 30 минут с 70 до 83%.

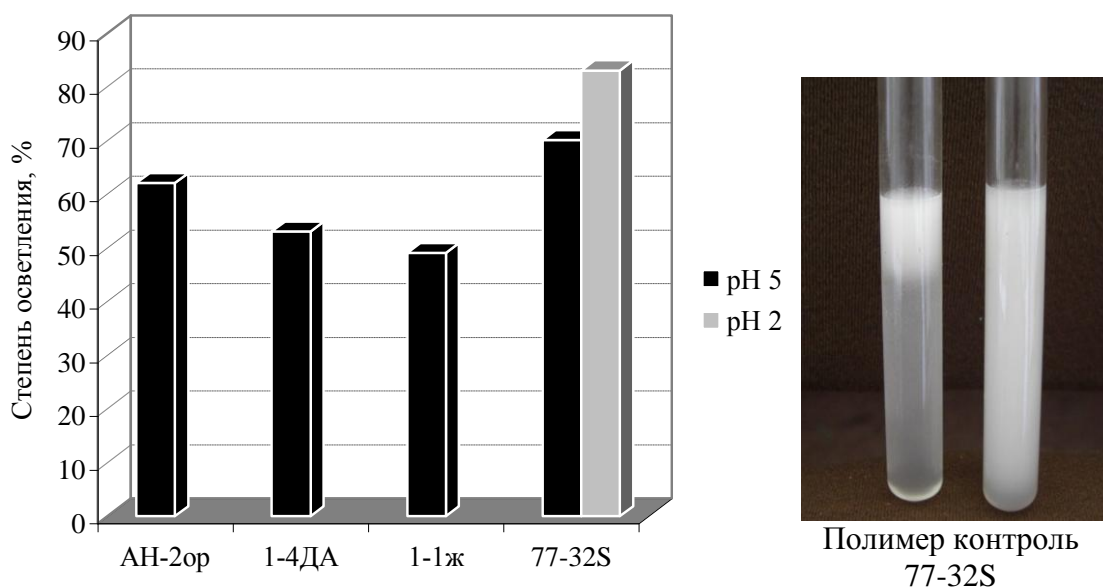


Рисунок 7. Осветление молочной сыворотки в присутствии экзополимеров микроорганизмов (200 мг/л) при 25 °С в течение 30 минут

Перспективным источником углерода для получения биофлокулянтов с помощью найденных продуцентов может служить глицерин, в том числе неочищенный, который образуется в значительных количествах при производстве биодизеля (1 л глицерина на 10 л биодизеля) [15]. Возможность и экономическая целесообразность использования глицерина в качестве источника углерода в микробиологических производствах уже показана на примере процессов получения ряда биотоплив и ценных химикалиев [16-19].

Выводы

Найдены 3 новые бактериальные культуры, продуцирующие внеклеточные полимеры, обладающие флокулирующей активностью. Обнаружено, что при культивировании продуцентов биофлокулянтов на среде с нефтью образуются крупные нефтяные агрегаты различной структуры, всплывающие к поверхности воды.

Выявлено, что перспективным источником углерода для получения экзополимеров может служить глицерин – отход производства биодизеля.

Установлено, что экзополимеры, синтезированные с помощью найденных микроорганизмов, проявляют в процессе осаждения каолина высокую флокулирующую активность в широком диапазоне кислотности среды (рН 2-11), которая

при оптимальных значениях pH достигает 85-95%. Оптимальная концентрация экзополимеров составляет 50-400 мг/мл. Показано, что экзополимер бактерий *Rhodococcus sp.77-32S* вызывает агрегацию и флотацию белков, содержащихся в молочной сыворотке.

Литература

1. Бакулин А.В. Получение и исследование комплексов хитозана и его производных с белками и меланинами: автореф. дисс... канд. техн. наук. М., 2011. 25 с.
2. Gao H.Y., Bao M.X., Xin Y.X., Liu Q. Li, Zhang Y.F. Characterization of a bioflocculant from a newly isolated *Vagococcus sp. W31* // J. Zhejiang Univ. Sci. B.2006. V. 7, №3.P. 186–192
3. Deng S.B., Bai R.B., Hu X.M., Deng Q., Luo S.B. Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V.60, №5. P.588–593
4. Полисахариды в процессах водоподготовки и переработки сточных вод различного состава /Братская С.Ю.и др // Вестник ДВО РАН. 2006. №5.С. 47-56
5. Liu Q., Zhang Y., Zhao D., Zhao Ch. On an ecology-friendly treatment reagent for oily wastewater // Journal of Chongqing University (English Edition). 2010. V. 9, № 3. P. 133-138
6. Kurane R., Takeda K., Suzuki T. Screening for and characteristics of microbial flocculants // Agric. Biol. Chem.1986.V. 50. P. 2301–2307
7. Шараева А.А., Петухова Н.И., Зорин В.В. Синтез экзополимера – перспективного реагента для интенсификации процессов биодegradации нефтяных загрязнений *S*-диссоциантом актинобактерий *Rhodococcus sp. USPTU-21* // Нефтегазовое дело.2012. Т.10, № 3. С. 151-154
8. Шараева А.А., Петухова Н.И., Зорин В.В. /Исследование условий синтеза экзополимера *S*-диссоциантом актинобактерий *Rhodococcus sp. USPTU-21* // Башкирский химический журнал. 2012.Т. 19, № 4. С.57-61
9. Zulkeflee Z., Aris A., Shamsuddin Z., Yusoff M. Cation dependence, PH tolerance, and dosage requirement of a bioflocculant produced by *Bacillus spp. UPMB13*: flocculation performance optimization through kaolin assays // The Scientific World Journal.2012, Article ID 495659. P. 1-7
10. Zhu Ch., Chen Ch., Zhao L., Zhang Y., Yang J., Song L., Yang Sh. Bioflocculant produced by *Chlamydomonas reinhardtii* // J Appl Phycol.2012.V. 24. P. 1245–1251
11. Liu W., Wang K., Li B., Yuan H., Yang J. Production and characterization of an intracellular bioflocculant by *Chryseobacterium daeguense* W6 cultured in low nutrition medium Bioresource Technology. V. 101. 2010. P. 1044–1048

12. Cheng J., Zhang L., Wang W., Yang Y., Zheng M. Screening of flocculant - producing microorganisms and flocculating activity // *Journal of Environmental Sciences*. V.16, № 6. 2004. P. 894-897
13. Особенности осаждения сывороточных белков флокулянтами /Шевченко Т.В. и др. // *Современные наукоемкие технологии*. 2008. № 2. С. 67-68
14. Корниенко О.Н., Птичкина Н.М. Осаждение белков молочной сыворотки с помощью пищевого полисахарида // *Вестник Саратовского агроуниверситета им. Н.И. Вавилова*. 2010. №5. С. 7-11
15. Dobson R., Gray V., Rumbold K. Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products // *J Ind Microbiol Biotechnol*.2012.V. 39. P. 217–226
16. Перспективные направления переработки и утилизации глицерина /Зорин В.В. и др. // *Российский химический журнал. ЖВХО им. Д.И. Менделеева*. 2011.V. 55, № 1.С. 77-88
17. Silva G.P, Mack M, Contiero J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*. 2009. V. 27, №1. С. 30-39
18. Amaral P., Ferreira T., FonteS G., Coelho M. Glycerol valorization: new biotechnological routes // *Food and Bioproducts Processing*. 2009.V. 87, № 3.P. 179-186
19. Ashby R., Solaiman D., Foglia T. Bacterial Poly(hydroxyalkanoate) polymer production from the biodiesel co-product stream // *Journal of Polymers and the Environment*.2004.V. 12, № 3.P.105-112

RESEARCH OF FLOCCULATING ACTIVITY OF PETROLEUM-OXIDATING BIOCENOSIS MICROORGANISMS EXOPOLIMERS

A.A. Sharaeva, R.M. Meftakhov, N.I. Petukhova, V.V. Zorin
FSBEI Ufa state petroleum technological university
e-mail: metilorang89@mail.ru

Abstract. According to research results of properties of 27 cultures isolated from petroleum contaminated soil samples, 3 novel promising producers of bioflocculants. It is found that cultivation of bioflocculants producers on the petroleum-containing medium leads to large petroleum agglomerations formation. The ability of biodiesel production by-product – glycerol – to serve as the promising carbon source for exopolymer synthesis is shown. Influence of medium acidity, temperature and concentration of bioflocculant on kaolin precipitation rate was studied. High flocculation activity in vast range of medium acidity (pH 2-11) of exopolymers synthesized by isolated microorganisms with its maximum 85-95% at optimal pH is found. Optimal concentrations of exopolymers were 50-400 mg/ml. The possibility of polymer use for lactoserum fractionation is shown.

Keywords: bioflocculants, oil, microorganisms, *Rhodococcus*, extracellular polymer

References

1. Bakulin A.V. Preparation and investigation of complexes of chitosan and its derivatives with proteins and melanins: author. disser ... cand. tech. Science. M., 2011. 25.
2. Gao H.Y., Bao M.X., Xin Y.X., Liu Q. Li, Zhang Y.F. Characterization of a bioflocculant from a newly isolated *Vagococcus* sp. W31 // J. Zhejiany Univ. Sci. B.2006. V. 7, № 3.P. 186-192
3. Deng S.B., Bai R.B., Hu X.M., Deng Q., Luo S.B. Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V.60, № 5. P.588-593
4. Fraternal SY, Chervonetsky DV, Avramenko VA Yudakov AA, Yehkam, AA, VI Sergienko Polysaccharides in Water Treatment and refining waste water of different composition // Bulletin FEB RAS. 2006. № 5.S. 47-56
5. Liu Q., Zhang Y., Zhao D., Zhao Ch. On an ecology-friendly treatment reagent for oily wastewater // Journal of Chongqing University (English Edition). 2010. V. 9, № 3. P. 133-138

6. Kurane R., Takeda K., Suzuki T. Screening for and characteristics of microbial flocculants // *Agric. Biol. Chem.* 1986. V. 50. P. 2301-2307
7. Sharaeva AA Petukhov N., V. Zorin Synthesis ekzopolimera - promising agent for the intensification of the processes of biodegradation of oil pollution S-dissociants actinobacteria *Rhodococcus* sp. USPTU-21 // *Neftgazovoe delo*. 2012. Vol. 10, № 3. Pp. 151-154
8. Sharaeva AA Petukhov N., V. Zorin Study of synthesis conditions ekzopolimera S-dissociants actinobacteria *Rhodococcus* sp. USPTU-21 // *Bashkir Chemistry journal*. 2012. T. 19, № 4. P. 57-61
9. Zulkeflee Z., Aris A., Shamsuddin Z., Yusoff M. Cation dependence, PH tolerance, and dosage requirement of a bioflocculant produced by *Bacillus* spp. UPMB13: flocculation performance optimization through kaolin assays // *The Scientific World Journal*. 2012, Article ID 495659. P. 1.7
10. Zhu Ch., Chen Ch .., Zhao L., Zhang Y., Yang J., Song L., Yang Sh. Bioflocculant produced by *Chlamydomonas reinhardtii* // *J. Appl Phycol*. 2012. V. 24. P. 1245-1251
11. Liu W., Wang K., Li B., Yuan H., Yang J. Production and characterization of an intracellular bioflocculant by *Chryseobacterium daeguense* W6 cultured in low nutrition medium *Bioresource Technology*. V. 101. 2010. P. 1044-1048
12. Cheng J., Zhang L., Wang W., Yang Y., Zheng M. Screening of flocculant - producing microorganisms and flocculating activity // *Journal of Environmental Sciences*. V. 16, № 6. 2004. P. 894-897
13. Especially precipitation of serum proteins flocculants / Shevchenko T.V. etc. // *Modern high technologies*. 2008. Number 2. Pp. 67-68
14. Kornienko, ON, Ptichkin NM Protein precipitation breast serum with edible polysaccharide // *Saratov Journal Agrouniversity them. N.I. Vavilov*. 2010. Number 5. C. 7.11
15. Dobson R., Gray V., Rumbold K. Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products // *J. Ind Microbiol Biotechnol*. 2012. V. 39. P. 217-226
16. Perspective directions of processing and recycling glitseri-na/Zorin VV etc. // *Russian Chemical Journal. ZHVHO them. D.I. Mendeleev*. 2011. V. 55, № 1. P. 77-88
17. Silva G.P, Mack M, Contiero J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*. 2009. V. 27, № 1. Pp. 30-39
18. Amaral P., Ferreira T., FonteS G., Coelho M. Glycerol valorization: new biotechnological routes // *Food and Bioproducts Processing*. 2009. V. 87, № 3. P. 179-186
19. Ashby R., Solaiman D., Foglia T. Bacterial Poly (hydroxyalkanoate) polymer production from the biodiesel co-product stream // *Journal of Polymers and the Environment*. 2004. V. 12, № 3. P. 105-112

Сведения об авторах

Шараева А.А., аспирант кафедры «Биохимия и технология технологических производств», ФГБОУ ВПО УГНТУ

A.A. Sharaeva, graduate of chair of «Biochemistry and microbiology technology industries», FSBEI USPTU

Мефтахов Р.М., студент гр. МТБ-10-01, ФГБОУ ВПО УГНТУ

R.M. Meftakhov., student of chair of «Biochemistry and microbiology technology industries», FSBEI USPTU

Петухова Н.И., канд. биол. наук, доцент кафедры «Биохимия и технология микробиологических производств», ФГБОУ ВПО УГНТУ

N.I. Petukhova, Ph.D, biol. sci. associate professor of chair of «Biochemistry and microbiology technology industries», FSBEI USPTU

Зорин В.В., д-р. хим. наук, заведующий кафедрой «Биохимия и технология микробиологических производств», ФГБОУ ВПО УГНТУ

V.V. Zorin, dr chem.sci, head of chair of «Biochemistry and microbiology technology industries», FSBEI USPTU

e-mail: metilorang89@mail.ru