

УДК 502.51

## БИОКОМПОЗИТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ОЧИСТКИ ВОДНЫХ СРЕД, ЗАГРЯЗНЕННЫХ УГЛЕВОДОРОДАМИ

© 2019 г. Е. А. Иванова<sup>1, \*</sup>, Е. С. Лобакова<sup>2</sup>, Р. К. Идиатулов<sup>3</sup>, Т. Н. Шапиро<sup>2</sup>, Д. А. Санджиева<sup>1, 4</sup>, О. В. Кузнецова<sup>1</sup>, Ю. Н. Зайцева<sup>1</sup>, Х. С. Джабраилова<sup>1</sup>, А. Г. Дедов<sup>1, 4</sup>

<sup>1</sup>Российский государственный университет нефти и газа (НИУ) имени И.М. Губкина, Москва, Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия

<sup>3</sup>АО «Научно-исследовательский институт синтетического волокна с экспериментальным заводом», Тверь, Россия

<sup>4</sup>Институт общей и неорганической химии РАН, Москва, Россия

\*E-mail: dedov.a@gubkin.ru

Поступила в редакцию 01.11.2018 г.

После доработки 27.11.2018 г.

Принята к публикации 10.12.2018 г.

Создан биокomпозитный материал на основе полимерной матрицы (сополимер акрилонитрила и метилметакрилата) с инкорпорированными биогенными элементами в виде свекольного жома и иммобилизованными штаммами бактерий или ассоциацией бактерий, выделенных из зараженных нефтепродуктов. Была показана высокая активность созданного материала в процессах очистки модельной морской воды от углеводородов (УВ).

**Ключевые слова:** биокomпозитный материал, полимерная матрица, ассоциации бактерий.

**DOI:** 10.1134/S0028242119030080

### ВВЕДЕНИЕ

Россия занимает одно из первых мест в мире по добыче нефти, однако, в ходе ее добычи, хранения и транспортировки могут происходить аварийные утечки, отравляющие почву и водоемы. Так, по оценкам Greenpeace в России порядка 4.5 млн т нефти в год попадает в окружающую среду в результате ее аварийных разливов [1]. Попадающие в водоемы нефть и нефтепродукты (Н и НП) существенно изменяют условия обитания всех видов живых организмов, а также негативным образом сказываются на здоровье людей, приводя к росту числа онкологических и других хронических заболеваний [2]. К настоящему моменту существует ряд методов ликвидации аварийных разливов Н и НП на акваториях и очистки сточных вод от Н и НП, но все они не являются универсальными и безупречными с экологической точки зрения. Поэтому в лабораториях во всем мире ведется поиск новых методов и разработка материалов для очистки сточных вод и акваторий от Н и НП [3–10].

Одним из путей решения этой проблемы может стать создание биокomпозитных материалов (БКМ) на основе нетканых полимерных матриц, растительных наполнителей и углеводородокисляющих микроорганизмов. Подобные материалы будут способны не просто сорбировать Н

и НП из воды, но и биоградировать их до углекислого газа и воды.

Ранее нами была разработана методология синтеза БКМ [11, 12]. Создание полимерных БКМ сложной иерархической структуры, включает в себя ряд последовательных этапов. На первом этапе выбор химической природы полимерной матрицы позволяет варьировать гидрофильно-гидрофобные свойства синтезируемого БКМ. Вторым этапом синтеза БКМ является обогащение матриц растительным наполнителем, содержащим биогенные элементы (фосфор, азот и др.), необходимыми микроорганизмам для роста и физиологической активности, которые, кроме того, создают для микроорганизмов среду обитания, близкую к естественной. Третий этап – иммобилизация микроорганизмов, обладающих необходимыми полезными свойствами, на наполненной полимерной матрице. Для создания БКМ в соответствии с этой методологией необходимо существенно расширить круг микроорганизмов, обладающих способностью эффективно биоградировать УВ классов до экологически благоприятных продуктов и способных работать в составе БКМ как в виде индивидуальных штаммов, так и в составе ассоциации микроорганизмов.

Цель данной работы – исследование БКМ на основе штаммов и ассоциаций бактерий, выде-

**Таблица 1.** Механические характеристики полимерной матрицы СПАН с наполнителем – свекольный жом

Тип	Толщина, мм	Воздухопроницаемость, $\text{дм}^3/(\text{м}^2 \text{ с})$	Поверхностная плотность, $\text{г}/\text{м}^2$	Объемная плотность, $\text{г}/\text{см}^3$	Пористость, %	Наполнитель
СПАН	1.58	108.5	159	0.1	91.5	Жом свекольный

ленных из микробиологически зараженных нефтепродуктов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Синтез БКМ.** В качестве полимерной матрицы был выбран сополимер акрилонитрила и метилметакрилата (СПАН), в качестве растительного наполнителя, инкорпорированного в полимерную матрицу, – свекольный жом (ГОСТ Р 54901-2012). В качестве микроорганизмов для иммобилизации на наполненной полимерной матрице были использованы штаммы бактерий *Ochrobactrum* sp. и *Deinococcus* sp., выделенные из микробиологически зараженного реактивного топлива ТС-1.

Материалы на основе СПАН получали методом аэродинамического формования фильерным способом из расплава полимера. Для модификации полимерных волокон биогенными наполнителями использовали свекольный жом. Инкорпорирование осуществляли следующим образом: свекольный жом измельчали, вводили в расплав полимера и перемешивали (концентрация свекольного жома в расплаве полимера составляла 25%). Механические характеристики полученной полимерной матрицы с растительным наполнителем приведены в табл. 1.

Выделение и идентификацию штаммов бактерий из зараженного реактивного топлива ТС-1 проводили, как описано ранее [2].

Для получения БКМ использовали одинаковые по площади кусочки полимерной матрицы с растительным наполнителем ( $3 \text{ см}^2$ ). Иммобилизацию клеток бактерий-деструкторов УВ и ассоциацию бактерий осуществляли адсорбционным методом на поверхность синтезированных матриц. Для этого в каждую колбу со средой с на-

ращенной культурой микроорганизмов (объем 100 мл) помещали матрицы полимера с инкорпорированным свекольным жомом ( $3 \times 3 \text{ см}$ ). Иммобилизацию проводили на орбитальном шейкере В. Braun RS-1-T (INFORS AG, Германия), скорость вращения 120 об/мин, температуре  $24^\circ\text{C}$  в течение 3 сут.

Были синтезированы БКМ на основе СПАН – свекольный жом – *Ochrobactrum* sp. (БКМ-1) и СПАН – свекольный жом – ассоциация бактерий *Ochrobactrum* sp. и *Deinococcus* sp. (БКМ-2).

**Методы исследования биodeградации углеводородов в модельной водно-органической смеси (МС) бактериями и БКМ.** Эксперименты по биodeградации УВ штаммами бактерий проводили в колбах Эрленмейера: в колбу вносили 100 мл среды Эванса и 1 мл смеси УВ (*n*-алканы:  $\text{C}_{15}\text{H}_{32}$ ,  $\text{C}_{16}\text{H}_{34}$ ,  $\text{C}_{18}\text{H}_{38}$  и триметилбензол), затем в колбы вносили штаммы бактерий *Ochrobactrum* sp. и (или) *Deinococcus* sp., выращенные на твердой питательной среде Rich 10, микробиологической петлей (по 2 петли). Эксперименты по биodeградации УВ БКМ проводили в колбах Эрленмейера: в колбу вносили 100 мл искусственной морской воды и 1 мл смеси УВ (*n*-алканы:  $\text{C}_{15}\text{H}_{32}$ ,  $\text{C}_{16}\text{H}_{34}$ ,  $\text{C}_{18}\text{H}_{38}$  и триметилбензол), затем помещали образцы БКМ размером  $9 \text{ см}^2$  ( $3 \times 3 \text{ см}$ ). В обоих случаях колбы помещали на орбитальный шейкер-инкубатор Ika KS 4000I control (ИКА, Германия), перемешивание проводили со скоростью 150 об./мин непрерывно в течение 7, 14 и 21 сут при температуре  $24\text{--}25^\circ\text{C}$ . Состав искусственной морской воды представлен в табл. 2.

Анализ остаточного содержания УВ проводили на 7, 14 и 21 сут эксперимента. В качестве контрольного образца использовали МС без внесенных бактерий или БКМ.

Выделение УВ из МС, осуществляли трехступенчатой экстракцией *n*-гексаном. Органические вытяжки объединяли, для удаления остаточной воды из экстракта использовали  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  б/в. Объем экстракта довели гексаном до 80 мл.

Остаточные УВ из БКМ экстрагировали *n*-гексаном с использованием ультразвуковой ванны. Экстракцию проводили 3 раза, органические вытяжки объединяли, для удаления остаточной воды из экстракта использовали  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  б/в. Объем экстракта довели гексаном до 80 мл.

**Таблица 2.** Состав искусственной морской воды

Компоненты среды	Концентрация, мг/л
NaCl	1750 ( $\text{Cl}^-$ )
$\text{K}_2\text{SO}_4$	2500 ( $\text{SO}_4^{2-}$ )
$\text{KNO}_2$	225 ( $\text{NO}_2^-$ )
$\text{KNO}_3$	16.5 ( $\text{NO}_3^-$ )
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	17.5 ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ )

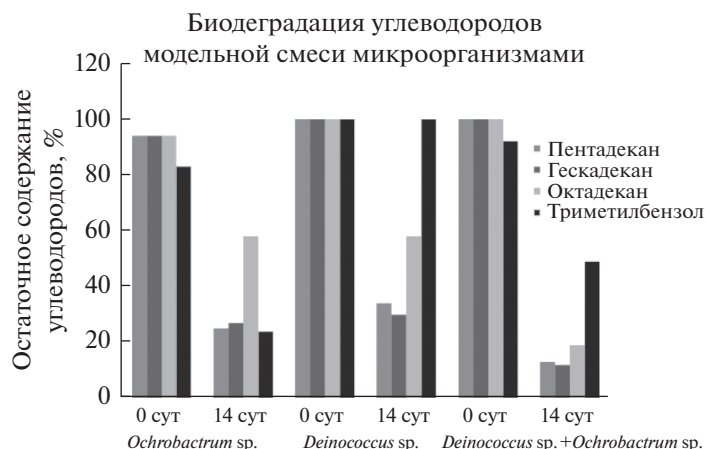


Рис. 1. Биодegradация углеводородов модельной смеси монокультурами *Ochrobactrum* sp. и *Deinococcus* sp. и их ассоциации.

Анализ массовых концентраций УВ в полученных пробах проводили методом ГЖХ.

**Анализ содержания остаточных углеводородов в модельных смесях методом ГЖХ.** Для анализа использовали газовый хроматограф YL 6100 с пламенно-ионизационным детектором (YL Instrument, Южная Корея). Разделение УВ проводили на неполярной кварцевой капиллярной хроматографической колонке TR-5MS, длиной 60 м, диаметром 0.25 мм, толщиной слоя неподвижной фазы 0.25 мкм, в качестве газа носителя использовали гелий, скорость потока газа-носителя составляла 3 мл/мин. Сбор и обработка хроматографических данных осуществляли с использованием программы “YL-Clarity”.

**Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).** Топографию заселения и распределения бактериальных клеток в БКМ-1 и БКМ-2 проводили с помощью сканирующей электронной микроскопии. Для этого образцы БКМ фиксировали в 2%-ном глутаровом альдегиде на кокадилатном буфере в течение 30 мин, затем обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации (10–100% в течение 10 мин в каждом растворе) и помещали на ночь в 100%-ный ацетон. Образцы высушивали при критической точке на установке “Dryer HCP-2” (Hitachi, Япония), напыляли золотом с палладием на ионно-напылительной установке “IB-3 IonCoater” (Eiko, Япония) и изучали с использованием сканирующего микроскопа Hitachi 405-S (Япония) при ускоряющем напряжении 15 Кв и инструментальном увеличении 60–20000.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Исследование активности бактерий *Ochrobactrum* sp. и *Deinococcus* sp. в процессах деструкции углеводородов.** Биологическим “инструментом” БКМ являются микроорганизмы, которые долж-

ны эффективно перерабатывать УВ до углекислого газа и воды. Источником таких микроорганизмов может служить микробиологически зараженное топливо, приводившее к нештатной работе двигателя. Представляло интерес исследовать активность бактерий, выделенных из этого топлива, в процессах деструкции УВ в водно-органических средах. Нами были выделены штаммы бактерий из зараженного топлива ТС-1 и было проведено исследование их активности в процессах биодegradации УВ [13]. По результатам предварительных опытов для дальнейших исследований были выбраны монокультуры бактерий *Ochrobactrum* sp. и *Deinococcus* sp. и их ассоциация. Было показано, что оба вида бактерий проявили высокую активность в процессах биодegradации УВ, причем в обоих случаях конечными продуктами биодegradации УВ были только углекислый газ и вода. Следует отметить, что бактерий *Ochrobactrum* sp. и *Deinococcus* sp. проявили близкую активность в процессах биодegradации *n*-алканов, так биодegradация алканов монокультурами *Ochrobactrum* sp. и *Deinococcus* sp. составляла от 43% – для октадекана до 75% – для пентадекана (рис. 1).

Ароматическое соединение – триметилбензол – биодegradировали только бактерии вида *Ochrobactrum* sp. (степень биодegradации составляла 75%), бактерии *Deinococcus* sp. оказались не способны утилизировать ароматические соединения. Наилучшие результаты были достигнуты при использовании ассоциации бактерий, включающей в себя обе культуры. Так, биодegradация алканов ассоциацией бактерий на 14 сут эксперимента составляла более 80%, а для триметилбензола – порядка 50% (рис. 1).

**Биодegradация углеводородов в модельных смесях (углеводороды–морская вода) БКМ-1 и БКМ-2.** Поскольку физиологические ответы клеточных популяций микроорганизмов в значительной

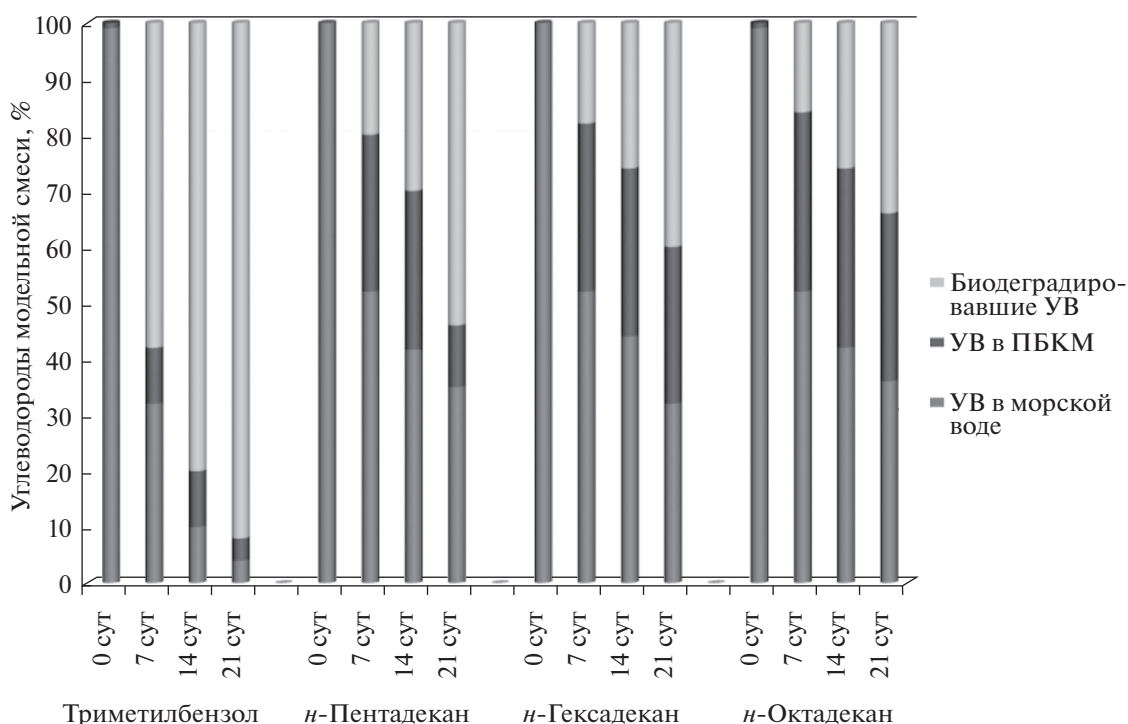


Рис. 2. Биодергазация углеводородов модельной смеси БКМ-1.

степени зависят от условий их культивирования, для дальнейшего повышения метаболической активности ассоциации проводили иммобилизацию их клеток на полимерную волокнистую матрицу, так как культуры иммобилизованных на носителях клеток характеризуются сниженной скоростью роста при сохранении высокой скорости метаболизма. В качестве наполнителя, инкорпорированного в полимерную матрицу, задачей которого является обеспечение микроорганизмов необходимыми для их жизни биогенными элементами и создания среды обитания, близкой к естественной, мы использовали свекольный жом – промышленно производимый продукт, являющийся отходом сельскохозяйственного производства. Результаты процесса биодергазации УВ модельной смеси БКМ-1 и БКМ-2 представлены на рис. 2 и 3. Как видно на рис. 2 БКМ-1 проявил высокую активность в процессах биодергазации ароматического соединения – триметилбензола. Степень его биодергазации на 7 сут составила почти 60%, на 14 сут – более 80%, а на 21 – 93%. Биодергазация *n*-алканов БКМ-1 на 7 сут составляла около 20%, на 14 сут – около 30%, а на 21 сут для *n*-пентадекана – 55%, для *n*-гексадекана и *n*-октадекана – порядка 40% (с учетом УВ, находящихся в матрице БКМ-1). При этом содержание *n*-алканов в морской воде на 7 сут составляло около 50% от исходной концентрации, на 14 сут – около 40%, а на 21 сут – чуть более 30%.

БКМ-2 проявил аналогичную активность в процессах биодергазации триметилбензола, и более высокую – в процессах биодергазации *n*-алканов (рис. 3). Так, степень биодергазации триметилбензола на 7 сут составила почти 50%, на 14 сут – более 80%, а на 21 – 93%. Биодергазация *n*-алканов БКМ-2 на 7 сут она составляла около 30%, на 14 сут – около 50%, а на 21 сут – более 60% (с учетом количества УВ, находящихся в матрице БКМ-2). При этом содержание *n*-алканов в морской воде на 7 сут составляло около 45% от исходной концентрации, на 14 сут – около 30%, а на 21 сут – порядка 5%. Как видно, в составе БКМ бактерии, будучи защищенными полимерной матрицей, способны гораздо более эффективно утилизировать высокотоксичное ароматическое соединение, чем свободноживущие бактерии. Таким образом, синтезированные БКМ проявили высокую активность в очистке загрязненной углеводородами модельной морской воды, сходную с ранее созданными нами БКМ на основе полимерных матриц с растительными наполнителями (*Sphagnum*, растения семейства Lemnaceae) и ассоциацией бактерий *Rhodococcus gingshengii* и *Leicobacter ardicolles*.

**Исследование особенностей заселения полимерных матриц и развития микроорганизмов в составе БКМ методом СЭМ.** При иммобилизации клеток ассоциации на носителях разной природы может меняться соотношение долей микроорганизмов в

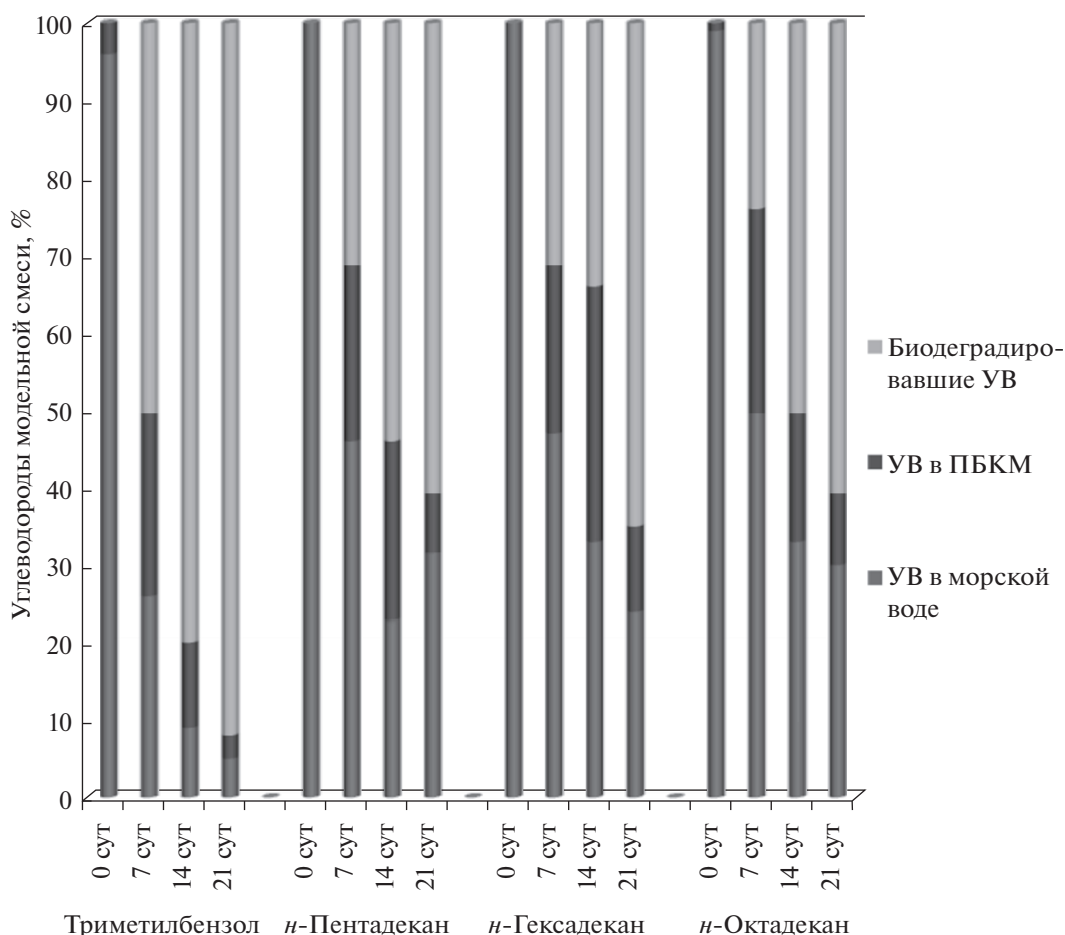


Рис. 3. Биодергазация углеводов модельной смеси БКМ-2.

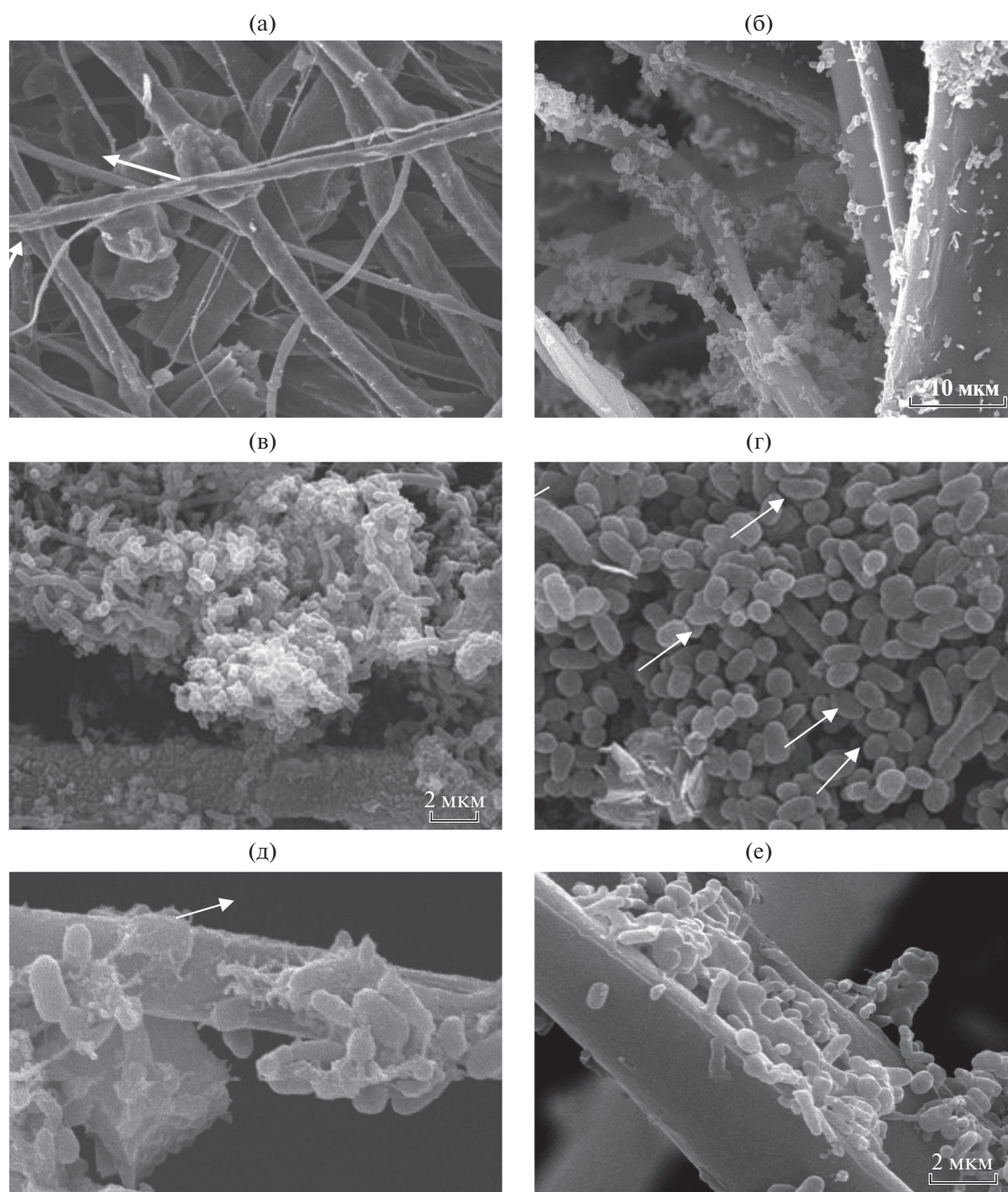
составе ассоциации получаемого БКМ и, как следствие, происходит изменение его активности. Процесс иммобилизации бактериальных клеток на волокнах полимерной матрицы может быть обусловлен, с одной стороны, эффективностью процесса адсорбции бактериальных клеток на поверхности волокон и, с другой, — отражать активное заселение волокон матрицы и межволоконного пространства вследствие размножения микробных клеток после прикрепления. Последнее может приводить к формированию на поверхности волокон и межволоконном пространстве матриц бактериальных микроколоний, флокул и биопленок вследствие активного деления клеток и (или) секреции или внеклеточного полимерного матрикса.

Модифицированная свекольным жомом волоконистая матрица представляет собой материал, образованный рыхло переплетающимися волокнами разной формы и диаметра: округлыми, диаметром 2–12 мкм и более толстыми уплощенными — шириной 25–30 мкм (рис. 4а). Поверхность волокон неровная имеет небольшие вдавления и

желобки. Некоторые волокна имеют утолщения, в которых, по-видимому, локализованы фрагменты свекольного жома (рис. 4а указано стрелками).

Как на поверхности волокон синтезированных БКМ-1 и БКМ-2, так и в пространстве между волокнами наблюдается присутствие как одиночных бактериальных клеток, так и микроколоний и микрофлокул. В случае БКМ-2 присутствуют бактериальные клетки разных типов: палочки ((1–1.5) × 3 мкм) и кокки (1.5 × 1.5 мкм) (рис. 4б БКМ-2, 14 сут). Одиночные клетки бактерий располагаются свободно, образование слизистого полимерного матрикса не наблюдается.

На 7–21 сут исследования образцов БКМ-1 и БКМ-2 наблюдается активное заселение бактериальными клетками как волокон полимерной матрицы, так и межволоконного пространства, формирование микроколоний, выделение полимерного матрикса, формирование на поверхности волокон биопленки и образование флокул в межволоконном пространстве. В составе внеклеточного полимерного матрикса бактериальные



**Рис. 4.** Особенности распределения бактериальных клеток в БКМ: а – общий вид БКМ-1 (а) – *Ochrobactrum* sp., 0 сут); (б) – БКМ-2 – одиночные клетки и микроколонии бактерий разного морфотипа на поверхности волокна и многочисленные флокулы в бактериальной ассоциации в межволоконном пространстве; (в) – клетки *Ochrobactrum* sp. на поверхности волокон БКМ и флокула бактерий в межволоконном пространстве БКМ-1 на поверхности волокон матрицы на 1–21 сут); (г) – бактериальная ассоциация *Ochrobactrum* sp. и *Deinococcus* sp. БКМ-2 на поверхности образца (клетки *Ochrobactrum* sp. указаны стрелками); (д) – образование внеклеточного полимерного матрикса (указано стрелками) и формирование микроколоний бактериальной ассоциацией *Ochrobactrum* sp. и *Deinococcus* sp., на поверхности волокон матрицы на 14 сут); (е) – углубление в волокне матрицы, заполненное микроколонией ассоциации *Ochrobactrum* sp. и *Deinococcus* sp., 21 сут), клетки бактерий интегрированы во внеклеточный полимерный матрикс.

клетки находятся в контакте друг с другом и способны осуществлять быструю комплексную перестройку субстрата. Внеклеточный полимерный

матрикс также является защитой от резких колебаний параметров среды культивирования и способствует сохранению жизнеспособности и метаболи-

ческой эффективности составляющих ассоциацию бактериальных клеток, то есть обеспечивает функциональную стабильность ассоциации.

На некоторых участках образцов БКМ на 21 сут вся поверхность оказывается покрыта бактериальными клетками. Следует отметить, что в образцах БКМ-2 выявляются бактериальные клетки как коккоидного, так палочковидного морфотипов. Это свидетельствует о том, что популяция бактериальных клеток в составе БКМ формируется двумя разными видами бактерий (рис. 4) и может свидетельствовать о ее стабильности.

Как видно в течение 21 сут происходит активный рост бактериальных клеток, что свидетельствует о том, что свекольный жом на протяжении всего этого периода способен обеспечивать развивающиеся популяции клеток всеми необходимыми биогенными элементами.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что штаммы бактерий, выделенные из микробиологически зараженного топлива, *Ochrobactrum* sp. и *Deinococcus* sp. могут быть использованы для создания БКМ. Кроме того, возможно применение свекольного жома в качестве биогенного наполнителя при создании БКМ. Синтезированные на основе этих материалов БКМ проявили высокую активность в процессах биодegradации УВ различных классов в водно-органических смесях до углекислого газа и воды. Наилучших результатов удалось достигать при использовании в составе БКМ ассоциации бактерий *Ochrobactrum* sp. и *Deinococcus* sp.

Такие материалы в дальнейшем могут стать основой для создания полностью безотходных и безопасных технологий ремедиации акваторий и очистки сточных вод предприятий нефтегазового комплекса.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках выполнения государственного задания 4.6718.2017/6.7 (Ведущие исследователи на постоянной основе), государственного задания 10.5422.2017/8.9, Российского фонда фундаментальных исследований в рамках реализации научного проекта № 18-29-05067, при поддержке программы Президиума

РАН № 34 “Актуальные проблемы физикохимии поверхности и создания новых композитных материалов.”

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Общественная экологическая организация Гринпис URL: <http://www.greenpeace.org/russia/ru/campaigns/oil-spills/>. Дата обращения 25.06.2018 г.
2. Sajna K.V., Sukumaran R.K., Gottumukkala L.D., Pandey A. // Bioresour. Technol. 2015. V. 191. P. 133.
3. Panneerselvan Logeshwaran, Mallavarapu Megharaja, Sreenivasulu Chadalavada, Mark Bowman, Ravi Naidu // Environmental Technology & Innovation 2018. V. 10. P. 175.
4. Листов Е.Л., Аконова Г.С., Балакирев И.В. // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. 2008. № 8. С. 9.
5. Скребняк Е. А., Терехова В.А., Федосеева Е.В., Ботвинко И.В., Винокуров В.А. // Экология и промышленность России. 2008. Сентябрь. С. 42.
6. Серебренникова М.К., Тудвасева М.С., Куюкина М.С. // Вестник Пермского университета. Биология. 2015. Вып. 1. С. 15.
7. Лейкин Ю.А., Черкасова Т.А., Н.А. Смагина Н.А. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2008. Т. 8. Вып. 4. С. 585.
8. Alvarez Cuenca M, Vezuli J., Lohi A., Upreti S.R. // Bioprocess and Biosystems Engineering. 2006. V. 29. № 1. P. 29.
9. Alejandro R. Gentilia, María A. Cubitto, Marcela Ferrero, María S. Rodríguez // Intern. Biodeterioration & Biodegradation. 2006. V. 57. P. 222.
10. Pirog T.P., Voloshina I.N., Gregirchak N.N., Shevchuk T.A. // Applied Biochemistry and Microbiology. V. 41. № 1. 2005. P. 51.
11. Дедов А.Г., Лобакова Е.С., Кащеева П.Б., Иванова Е.А., Идиатулов Р.К., Санджиева Д.А., Васильева С.Г., Бузник В.М., Кирпичников М.П. <https://elibrary.ru/item.asp?id=23450740> // Доклады Академии наук. 2015. Т. 462. № 4. С. 435 [Doklady Chemistry. 2015. V. 462. № 2. P. 160].
12. Lobakova E., Vasilieva S., Dolnikova G., Chekanov K., Kirpichnikov M., Kashcheeva P., Ivanova E., Idiatulov R., Buznik V., Dedov A. // Intern. Biodeterioration & Biodegradation. 2016. V. 108. P. 99.
13. Шапиро Т.Н., Дольникова Г.А., Немцева Н.В., Санджиева Д.А., Лобакова Е.С. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2018. № 4. С. 107.