

## ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДЛЯ АКТИВНОГО РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ -ДЕСТРУКТОРОВ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ

**В.М. Фарзалиев, Э.Р. Бабаев, Д.М. Кулиева, И.М. Эйвазова,  
К.Р. Кахраманова**

Институт химии присадок им.акад. А.М.Кулиева, НАН Азербайджана, г Баку

Оптимизированы питательные среды, содержащие в качестве источника углерода глюкозу, жидкие парафины, нефтяные фракции для культивирования микроорганизмов *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Mycobacterium lacticolum*-var *Alifaticum*. Изучено влияние концентрации посевной культуры, рН среды и температуры культивирования на продуктивность данных культур и выявлены оптимальные условия культивирования. Установлено, что максимальный синтез биомассы отмечается при использовании питательных сред № 3, 9, 13, 14 и 19 (в зависимости от источника углерода), рН 9, температурном режиме 37°C и концентрации посевной культуры – 1 %

Нефть и нефтяные углеводороды (парафины, циклопарафины, ароматические) являются наиболее распространенными загрязнителями окружающей среды.

Существует два пути интенсификации биодеградации углеводородов в окружающей среде-стимуляцией естественной нефтеокисляющей микрофлоры и введением в загрязненную экосистему активных углеводородокисляющих микроорганизмов, наряду с добавками солей азота и фосфора. Оба подхода дополняют друг друга.

Чтобы теоретически обосновать интродукцию определенных видов и предвидеть ее последствия, целесообразно сравнить физиологические и экологические характеристики наиболее распространенных углеводородокисляющих микроорганизмов. Чувствительность отдельных групп микроорганизмов к отдельным фракциям нефти определяется их химическим составом и физическими свойствами [1].

На основе активных штаммов микроорганизмов-нефтедеструкторов разработаны и созданы биопрепараты для ликвидации нефтезагрязнений окружающей среды [2]. Наиболее часто в разработках биологических препаратов используются бактерии родов *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Mycobacterium* и др.

В состав биопрепаратов включают штаммы по принципу их совместимости и высокой нефтеразлагающей активности. Эффективность процесса очистки зависит от ряда факторов, в том числе от фракционного состава исходной нефти, правильного выбора микроорганизма - деструктора, создания оптимальных составов питательных сред и условий их культивирования, выбора дозы инокуляции загрязненной нефтью почв микроорганизмами.

Цель работы – выбор оптимальных питательных сред и условий культивирования для активного роста микроорганизмов - деструкторов углеводородов.

В работе были использованы штаммы микроорганизмов из коллекции Института химии присадок НАНА, ранее выделенные из нефтеносных почв Апшеронского полуострова (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Mycobacterium lacticolum* var *Alifaticum*), которые поддерживали периодическим пересевом и выращивали непосредственно перед испытанием. Культивирование и оценку углеводородокисляющей активности бактерий проводили в питательных средах № 1- 19 (табл.1).

В качестве единственного источника углеродного питания были использованы: фракция Балаханской нефти (250 - 300<sup>0</sup>С,  $n_D^{20} = 1.4808$ ), фракция Биби-Эйбатской нефти (210-250<sup>0</sup>С,  $n_D^{20} = 1.4609$ ) глюкоза, н-парафины (C<sub>14</sub>-C<sub>16</sub>), нефть.

Культивирование бактерий проводили в 500 мл колбах Эрленмейера, содержащих 100 мл среды на лабораторных качалках при 160 об/мин и при температуре 37<sup>0</sup>С в течение 7 суток. Критерием оптимизации составов сред служили величины накапливаемой сухой биомассы, значения рН и степень деструкции нефти (%). Концентрацию бактериальной биомассы определяли весовым методом.

Предварительно в своих исследованиях для выращивания различных углеводород-окисляющих микроорганизмов использовали различные синтетические питательные среды. С целью повышения уровня накапливаемой биомассы и деструктивной активности были оптимизированы комплексные питательные среды для культивирования исследуемых микроорганизмов, обеспечивающие лучший рост этих культур.

Таблица 1. Оценка углеводородокисляющих свойств бактерий

Культура	Компоненты питательных сред, г/л																Деструкция углевод. %	Биомасса, мг		
	Питат. среда	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	MnCl <sub>2</sub>	FeSO <sub>4</sub>	NaCl	FeCl <sub>3</sub>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	NaNO <sub>3</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HP O <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> Cl	Глюкоза	н-Парафин C <sub>14</sub> -C <sub>16</sub>			Ул- фр 250-300 <sup>0</sup> С	Нефть
Pseudomonas-fluorecenses	1	1	1	0.2	0.02				0.01				1				1		62	250
	2	1.2	1.3	0.25	0.02				0.01				1				1		38	210
	3	1.3	1.4	0.3	0.02				0.01				1.5				1		53	325
	4	0.9	0.8	0.1	0.02				0.01				0.95				1		42	200
Pseudomonas-aeriginosa	5	1.5		0.5	0.1			0.1	0.01					2.5				1	25	70
	6	1	1	0.2	0.01	0.02	0.01	5.0		5.0				2.5				1	40	120
	7			1.5	0.5	0.1		0.1	0.01	3.0								1	65	200
Mycobacterium-lacticolum	8	0.7		0.8				0.7				1.5						1	30	100
	9	0.5	0.5	0.3				0.1	0.01		2.5							1	40	150
	10	0.5		0.5				0.2	0.01		1.0			0.1				1	25	50
	11	0.7		0.8	0.2			0.5			1.0	2.0		1						70
	12	1.5		1.0	0.4			1.0			2.0	2.0		1.5						150
	13	2.5		1.5	0.6			2.0			3.0	2.5		2.5						250
	14	0.5		0.4	0.1			0.3			0.5	1.0				1.0			13	50
	15	1.5		1.0	0.4			1.0			2.0	2.0				2.0			10	42
	16	3.5		2.0	0.8			2.5			4.0	3.0				3.0			11	40
	17	0.7		0.8				0.5				1.5							30	200
	18	0.5	0.5					0.7				1.5							32	250
19	0.5		0.5				0.5		0.01	1.0	2.0							54	270	

Результаты исследований внесены в табл. 1, откуда следует, что оптимальным составом для роста и размножения культур Pseudomonas fluorecenses является среда № 3; для Pseudomonas aeriginosa – среда № 7; для Mycobacterium lacticolum – в зависимости от природы углеводородного питания - № 9 (нефть), № 13 (глюкоза), № 14 (фр.210-250<sup>0</sup>С); № 19 (н-парафины (C<sub>14</sub>-C<sub>16</sub>)). Следует отметить, что культура Mycobacterium lacticolum по-разному реагирует на наличие в среде углеродного питания. В присутствии глюкозы и жидкого парафина происходит активное накопление биомассы. Однако, очень слабо они развиваются в присутствии нефтяной фракции с T<sub>кип.</sub> = 210-250<sup>0</sup>С. Для изучения влияния рН

среды на рост и развитие культуры *Pseudomonas fluorescens* приготовили образцы питательной среды *Bushnella Naas*, следующего состава, г/л:

$K_2HPO_4$  - 1;  $KH_2PO_4$  - 1;  $NH_4NO_3$  - 1;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,2;  $FeCl_3$  - 0,01;  $CaCl_2$  - 0,02; вода - 1000 мл с различными значениями pH (от 2 до 9). Культивирование микроорганизмов проводили в 500 мл колбах Эрленмейера, содержащих 100 мл среды в течение 5 суток. После стерилизации сред, в колбы добавляли по 1 мл культуральной суспензии и 1 г углеводорода (фр.250-300<sup>0</sup>). Для исследования *Mycobacterium lacticum* var *Alifaticum* была использована среда следующего состава, г/л:

$(NH_4)_2HPO_4$  - 1.5;  $KH_2PO_4$  - 0.7; NaCl - 0.7;  $MgSO_4$  - 0.8; вода - 1000 мл

В качестве углеводородного источника питания были взяты фр.(210-250<sup>0</sup>C) и жидкие парафины. Ход работы аналогичен предыдущему. Результаты приведены в табл.2.

Предварительный визуальный анализ показал, что при pH 2-5 рост бактерий не наблюдается. При pH 6 начинается развитие биомассы и при pH 8-9 оно достигает своего максимума. Наибольший прирост биомассы наблюдается в образце с первоначальным значением pH 9, которое в результате культивации снизилось до pH 8 (табл.2). При исследовании зависимости продуцирующей способности *Mycobacterium lacticum* var *Alifaticum* от pH было установлено, что при исходном значении pH 9-10 культура синтезирует повышенное количество биомассы. При этом значение pH в процессе культивирования снижается до 8.0-8.2. При этих значениях pH выход биомассы наибольший. Также было изучено влияние концентрации посевной культуры на окислительные свойства бактерий. С этой целью в среду вносили 0.5-4 % инокулята.

Таблица 2. Влияние pH среды на рост и развитие культур *Pseudomonas fluorescens* и *Mycobacterium lacticum* var *Alifaticum*

Культура	pH		Углеводород			Биомасса, мг
	До опыта	После опыта	Парафин (C <sub>14</sub> -C <sub>16</sub> )	Фракция (250-300 <sup>0</sup> C) n <sub>D</sub> <sup>20</sup> =1.4808	Фракция (210-250 <sup>0</sup> C) n <sub>D</sub> <sup>20</sup> =1.4609	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2	2	-	1 мл	-	10
	3	3	-	1 мл	-	10
	4	4	-	1 мл	-	15
	5	5	-	1 мл	-	30
	6	6	-	1 мл	-	50
	7	6	-	1 мл	-	60
	8	8	-	1 мл	-	70
	9	8	-	1 мл	-	100
<i>Mycobacterium lacticum</i> var. <i>Alifaticum</i>	2	2	1 мл	-	-	0
	3	2	-	-	1 мл	0
		3	3	1 мл	-	-
	4	3	-	-	1 мл	0
		4	4	1 мл	-	-
	5	4	-	-	1 мл	0
		5	5	1 мл	-	-
	6	5	-	-	1 мл	25
		6	6	1 мл	-	-
	7	6	-	-	1 мл	50
		7	7	1 мл	-	-
	8	7	-	-	1 мл	50
		8	8	1 мл	-	-
	9	7.5	-	-	1 мл	70
8.2		1 мл	-	-	250	
8.0		-	-	1 мл	100	
10	8.5	1 мл	-	-	210	
	8.5	-	-	1 мл	150	

Изучение влияния pH среды на развитие *Pseudomonas fluorescens* (табл.3) показало, что нет четкой корреляции между количеством культуры, взятой для засева ферментационных сред, показателями pH и количеством полученной биомассы. С увеличением количества посевной культуры основные показатели культивирования не улучшаются.

Исследования влияния концентрации посевного материала на окисляющие свойства *Pseudomonas fluorescens* и *Mycobacterium lacticolum-var Alifaticum* (табл.3) показали, что при применении в качестве углеводородного питания жидкого парафина максимальный выход биомассы получается при использовании 3% инокулята, при использовании же нефтяной фракции в качестве углеводородного питания наибольший выход биомассы получается при внесении в среду 1% инокулята.

Таблица 3. Влияние концентрации посевной культуры на окисляющие свойства бактерий *Pseudomonas fluorescens* и *Mycobacterium lacticolumvar Alifaticum*

Культуры	Питательная среда	Конц-я посевной культуры, %			pH		Биомасса, мг	
			Фракция 250-300°C $n_D^{20}=1.4808$	Парафины	До опыта	После опыта		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 1.4;	4	1	-	6	6	20	
		3	1	-	6	6	40	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1.3;	2	1	-	6	6	60	
		1.5	1	-	6	7	60	
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> – 1.5;	1	1	-	6	6	80	
		MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O – 0.3;	0.5	1	-	6	6	50
CaCl <sub>2</sub> – 0.02;								
FeCl <sub>3</sub> – 0.01;								
<i>Mycobacterium lacticolum-var Alifaticum</i>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 1,5;	0.5	-	1		7.2	130	
			-	-		7.2	50	
	1		-	1		7.2	250	
			-	-		7.2	220	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 0.7;	2		-	1		7.2	290
			-	-		7.2	170	
	NaCl – 0.7;	3		-	1		7.2	340
			-	-		7.2	200	
MgSO <sub>4</sub> – 0.8;	4		-	1		7.2	270	
		-	-		7.2	200		

Как видно из табл.3, дальнейшее повышение количества посевного материала способствовало повышению количества биомассы. Наилучший результат получен при использовании 1% инокулята, т.е. в этом случае выход биомассы максимален (80 мг).

Таким образом, в результате проведенных работ исследованы некоторые углеводородокисляющие микроорганизмы из коллекции Института химии присадок и отобраны культуры (бактерии рода *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium lacticolum*), способные

эффективно утилизировать некоторые индивидуальные углеводороды (глюкоза, жидкий парафин), а также нефтяные фракции.

Осуществлена оптимизация составов питательных сред, а также изучено влияние рН, температуры среды, концентрации посевного материала на окисляющую активность микроорганизмов. Об интенсивности микробиологических процессов при окислении углеводородов судили по изменению рН среды и по весу накапливаемой биомассы.

Выявлено, что микроорганизмы по-разному реагируют на углеводороды, использованные в качестве источника питания. Так, бактерии *Mycobacterium lactium* проявили эффективные окисляющие свойства при использовании в качестве углеводородного питания жидких парафинов  $C_{14}$ - $C_{16}$  и глюкозы. Однако, они оказались очень пассивными при использовании нефтяных фракций (210-250<sup>0</sup>С,  $n_D^{20} = 1.4609$ ). Оптимальными условиями их роста является использование питательной среды № 9 (нефть), № 13 (глюкоза), № 14 (фр.250-300<sup>0</sup>С) и № 19 (н-парафины ( $C_{14}$ - $C_{16}$ )).

Бактерии *Pseudomonas fluorescens* оказались активными деструкторами нефтяной фракции Балаханской нефти (250-300<sup>0</sup>С,  $n_D^{20} = 1,4808$ ). Установлено, что оптимальными условиями их роста и развития является использование питательной среды № 3, рН 9 и количества инокулята – 1 %.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Литвин Л.М., Зименко Т.Г./Изв.АН БССР. 1987. № 2.С. 2
2. Коронелли Т.В., Комарова Т.И., Ильинский В.В. и др. /Прикладная биохимия и микробиология. 1997. Т.33. № 2. С. 198.