

УДК 579.100

ИЗУЧЕНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ АССОЦИАЦИИ БАКТЕРИЙ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ НА ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛАХ РАЗЛИЧНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ

Е.С. Лобакова, С.Г. Васильева, Г.А. Дольникова, П.Б. Кашеева, А.Г. Дедов*

(кафедра биоинженерии; elena.lobakova@rambler.ru)

В настоящее время в мировой практике все большее применение для сбора нефти и нефтепродуктов находят синтетические сорбенты в виде нетканых волокнистых материалов. Системы, объединяющие сорбенты и ассоциации микроорганизмов, способных к окислению углеводородов нефти, позволяют создавать эффективные полифункциональные биогибридные материалы, предназначенные для сбора нефти и нефтепродуктов. Изучение особенностей взаимодействия ассоциаций бактерий-нефтедеструкторов (БНД) и полимерных материалов различной химической природы проводили методом сканирующей электронной микроскопии. Отмечена особенность прикрепления, а также специфичность клеточной морфологии бактериальных культур в зависимости от химического типа матрицы. Для изучения эффективности взаимодействия полимерных волокнистых нетканых материалов с БНД было проведено исследование динамики их адсорбции на поверхности различных матриц.

Ключевые слова: нетканые полимерные материалы, нефть и нефтепродукты, бактерии, иммобилизация, деструкция.

Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами занимает одно из первых мест по масштабу техногенных катастроф. В воды Мирового океана при аварийных разливах, происходящих на этапах добычи, транспортировки и переработки нефти, по разным оценкам, ежегодно попадает до 15—30 млн т нефти и нефтепродуктов, что крайне отрицательно сказывается на состоянии окружающей среды [1, 2].

Способность к деградации различных углеводородов (УВ) в почвах обнаружена у представителей более 20 родов бактерий, 19 родов дрожжей и 24 родов микроскопических мицелиальных грибов. Среди бактерий наиболее широко распространены в почвах *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Micrococcus* [3, 4].

Нефтяные загрязнения почвы и водных ресурсов разлагаются аэробными микроорганизмами в результате функционирования внутриклеточных оксидаз, участвующих в окислении CH_3 -, CH_2 - и CH -групп УВ. Основной вклад в процессы биохимического разрушения нефти вносят микроорганизмы, способные использовать УВ в качестве единственного источника углерода и энергии [5].

Наиболее важным в настоящее время является очищение природной среды от загрязнений при помощи иммобилизованных микроорганизмов. В связи с этим наиболее оправданным является поиск и селекция природных ассоциаций микроорганизмов-нефтедеструкторов из мест с высокой концентрацией

УВ и их последующая иммобилизация на полимерных матрицах различной химической природы.

Материалы и методы

Синтез полимерных матриц. Были синтезированы матрицы на основе полимерных волокнистых нетканых материалов (ПВНМ) различной химической природы (полипропилен, полиэфир, сополимер акрилонитрила с метилметакрилатом) (табл. 1). Синтез материалов на основе различных полимеров проводился фильерным способом: исходное сырье (в виде гранул) расплавляли или растворяли в плавильном/растворном устройстве, расплав/раствор полимера фильтровали для удаления примесей и продавливали через фильерный комплект с формированием волокон [6]. Синтезированные ПВНМ использовали в качестве матриц для иммобилизации бактерий при создании биогибридных материалов.

В качестве бактериального компонента биогибридного материала была выбрана двухкомпонентная ассоциация бактерий-нефтедеструкторов (БНД), состоящая из представителей рода *Rhodococcus* и *Leuconobacter*, выделенная из почвы грозненского месторождения нефти (Чеченская республика).

Изучение динамики адсорбции БНД на полимерных матрицах. Для изучения динамики адсорбции использовали покоящиеся клетки ассоциации, предварительно выращенные в питательной среде Эван-

* Кафедра общей и неорганической химии РГУ нефти и газа имени И.М. Губкина.

Таблица 1

Характеристика полимерных волокнистых нетканых материалов (ПВНМ)

Образец	Химический состав	Поверхностная плотность, г/м ²	Характер поверхности волокон	Плавучесть в течение суток
ПВНМ-1	Полипропилен (ПП)	192	гладкий	высокая
ПВНМ-2	Полиэфир (ПЭ)	134	гладкий, с редкими бугорками	средняя
ПВНМ-3	Сополимер акрилонитрила-метилметакрилата (СПАН)	102	наноструктурированная поверхность	низкая

са и затем ресуспендированные в натрий-фосфатном буфере.

Выращенную на твердой питательной среде Эванса ассоциацию БНД петлей переносили в колбу с жидкой средой аналогичного состава и культивировали в течение 3 сут. Для удаления остаточного субстрата клеточную суспензию центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин и два раза отмывали буфером. Отмытые от питательной среды клетки ресуспендировали в натрий-фосфатном буфере до концентрации $0,5 \times 10^8$, $1,0 \times 10^8$ или $2,0 \times 10^8$ клеток/мл. В каждую колбу объемом 100 мл помещали матрицы ПВНМ-1, ПВНМ-2, ПВНМ-3 размером 4×4 см и добавляли по 50 мл полученной суспензии клеток в натрий-фосфатном буфере. Иммобилизацию проводили на орбитальном шейкере (120 об/мин) при температуре 24 °С. Контролем служила суспензия ассоциации без добавления полимерной матрицы. Часть бактериальных клеток ассоциации иммобилизуется на поверхности полимерных волокон, что приводит к падению оптической плотности суспензии. Измерение оптической плотности проводили в динамике на концентрационном фотоэлектрическом колориметре при длине волны 540 нм через 15 мин, 30 мин, 1 ч, 3, 12, 24, 48, 72 ч. Эксперимент проводился в трех повторностях.

Адсорбционную емкость определяли по формулам

$$A = (A_0 - A_t) - 100\%/A_0, \quad [7]$$

где A — адсорбционная емкость, %; A_0 — оптическая плотность клеток в суспензии до иммобилизации, отн. ед.; A_t — оптическая плотность клеток в суспензии при иммобилизации в течение времени t , отн. ед.

$$C = (C_0 - C_t) - V/m, \quad [8]$$

где C — адсорбционная емкость носителя, сух. вес клеток, г/г матрицы; C_0 — концентрация клеток в суспензии до иммобилизации, сух. вес клеток, г/мл; C_t — концентрация клеток в суспензии в процессе иммобилизации в течение времени t , сух. вес клеток, г/мл; V — объем суспензии, мл; m — масса носителя, г.

Изучение особенностей иммобилизации БНД на полимерных матрицах методом сканирующей электронной микроскопии. Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) образцы полученных биогибридных

материалов фиксировали 2%-м раствором глутарового альдегида на 0,1 М какодилатном буфере pH 7,2 в течение 1,5 ч, обезвоживали в серии растворов этанола возрастающей концентрации, из 100%-го этанола переносили в 100%-й ацетон, затем высушивали при критической точке на установке “Dryer НСР-2” (Hitachi, Япония), напыляли золотом с палладием на ионно-напылительной установке “IB-3 Ion Coater” (Eiko, Япония) и исследовали с помощью микроскопа JSM-6380LA (JEOL, Япония).

Результаты и обсуждение

Изучение динамики адсорбции и десорбции бактериальных нефтеструктур на полимерных матрицах. Изучение динамики адсорбции в течение 15 мин, 30 мин, 1 ч и 3 ч (рис. 1, А) с момента погружения полимерных матриц различной химической природы (полипропилен, полиэфир, сополимер акрилонитрил-метилметакрилат (СПАН)) в суспензию клеток ассоциации показало, что для матрицы ПВНМ-2, изготовленной из полиэфира уже в течение первых 15 мин, наблюдается резкое снижение оптической плотности суспензии, что говорит о прикреплении значительного количества бактериальных клеток по сравнению с матрицами на основе полипропилена (ПВНМ-1) и сополимера акрилонитрила и метилметакрилата (ПВНМ-3).

Адсорбционная емкость ПВНМ-2 уже в течение 3 ч составила в среднем 22%, а для ПВНМ-1 и ПВНМ-3 только 2 и 5% соответственно.

Адсорбция клеток на поверхности полимерных матриц различной химической природы при иммобилизации в течение 24, 48, 72 ч была также наибольшей для ПВНМ-2 (рис. 1, Б). Количество иммобилизованных на ПВНМ-2 в течение 72 ч клеток было незначительно больше количества клеток, адсорбированных в течение 48 ч, что говорит о замедлении процесса. Как видно из рис. 1, Б, адсорбционная емкость ПВНМ-1 при иммобилизации в течение 48 ч составила приблизительно 27%, для ПВНМ-3 — 35%. Время иммобилизации в течение 48 ч можно считать оптимальным для всех матриц, так как при увеличении времени иммобилизации до 72 ч адсорбционная емкость ПВНМ-1 и ПВНМ-3 практически не изменяется, а для ПВНМ-2 увеличивается незначительно до 36%.

Адсорбционная емкость матриц

№ матрицы	Масса матрицы, г	Адсорбционная емкость носителя (С), сух. вес клеток, г/г матрицы (время иммобилизации 48 ч)
ПВНМ-1 (полипропилен)	0,188 ± 0,005	0,266 ± 33
ПВНМ-2 (полиэфир)	0,192 ± 0,007	0,876 ± 54
ПВНМ-3 (СПАН)	0,517 ± 0,018	0,102 ± 15

Для изучения динамики адсорбции были выбраны матрицы одинакового размера, однако изученные адсорбенты обладают различными техническими характеристиками (толщина, диаметр волокон, поверхностная плотность и т.д.). В табл. 2 представлены данные адсорбционной емкости носителей, определенных как отношение массы сухого веса адсорбированных

Таблица 2

клеток бактерий на 1 г матрицы; лучше всего заселяется микроорганизмами матрица на основе полиэфира.

Изучение динамики десорбции с поверхности матриц показало, что бактерии, входящие в состав исследованной ассоциации, более прочно прикреплялись к поверхности образцов ПВНМ-1 и ПВНМ-3. Изучение динамики адсорбции и десорбции БНД показало, что культура лучше всего адсорбируется на поверхности ПВНМ-2, но также легко десорбируется с поверхности этой матрицы, что говорит о слабом прикреплении клеток к поверхности полиэфирных волокон.

Исследование процесса иммобилизации БНД на полимерных материалах с помощью метода сканирующей электронной микроскопии. Исследование процессов адсорбции бактериальных культур на матрицах

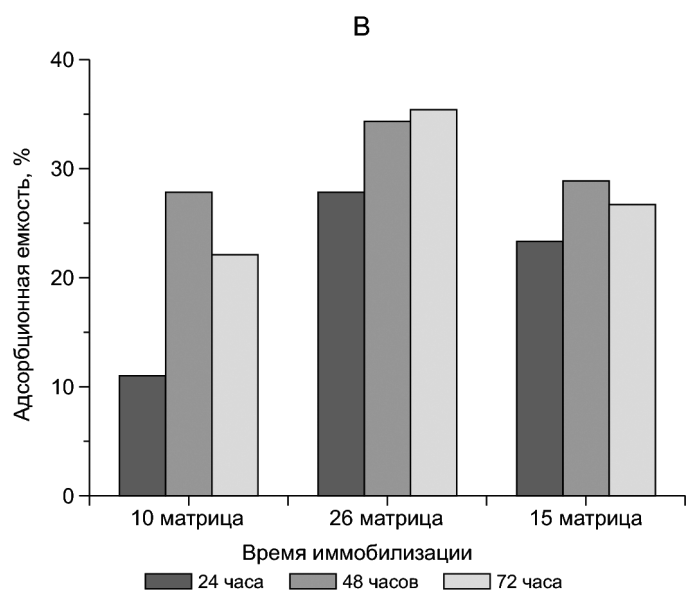
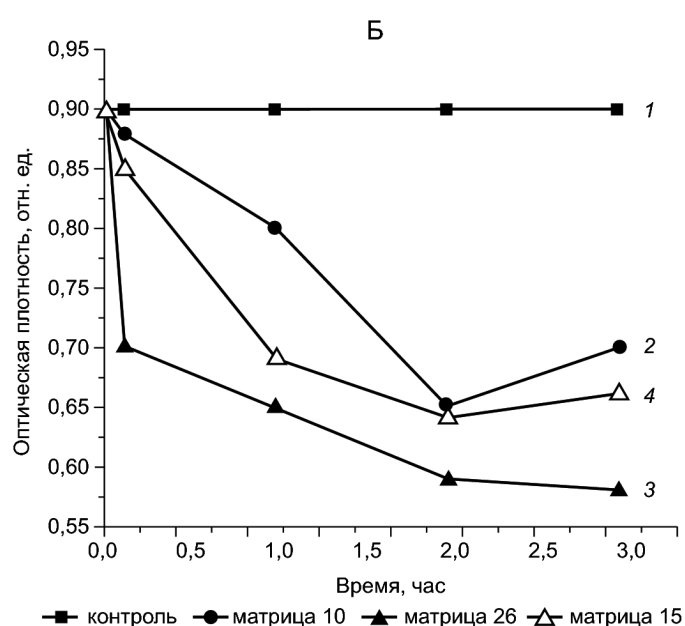
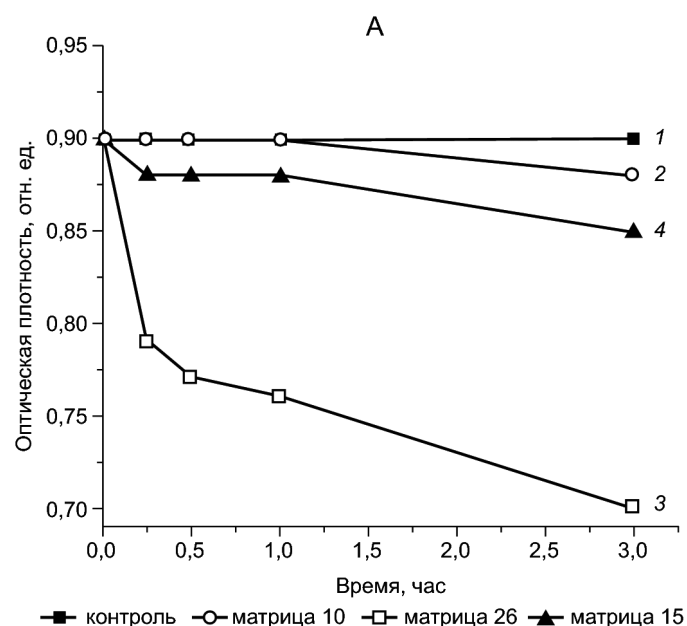


Рис. 1. Динамика адсорбции клеток модифицированной ассоциации БНД на поверхности полимерных матриц различной химической природы и адсорбционная емкость полимерных матриц. А — динамика адсорбции клеток: 15 мин, 30 мин, 1 ч и 3 ч. 1 — суспензия клеток родококков без матрицы; 2 — матрица № 10 (ПВНМ-1); 3 — матрица № 26 (ПВНМ-2); 4 — матрица № 15 (ПВНМ-3). Б — динамика адсорбции клеток: 24 ч, 48 ч, 72 ч. (обозначения те же, что на рис. 1, А). В — адсорбционная емкость полимерных матриц

различной природы (полиэфир, полипропилен, акрилонитрил-метилметакрилат) и определение морфофункционального состояния бактерий-нефтедеструкторов проводили с помощью сканирующей электронной микроскопии (JEOL). Характер взаимодействия культур и полимерных матриц при создании биогибридных материалов оценивали на основании следующих признаков: особенности локализации бактерий-нефтедеструкторов на волокнах полимерных матриц, особенности морфологии и цикла развития бактериальной культуры. На всех типах выбранных полимерных матриц нами обнаружено закрепление бактериальных клеток. Однако характер прикрепления клеток к волокнам матриц различной природы отличается, также обнаружена специфичность морфологии БНД.

Матрицы различной химической природы (полипропилен, полиэфир, акрилонитрил-метилметакрилат) имеют различный набор функциональных групп и разные технические характеристики (толщина волокон и плотность упаковки волокон в полотне, характер поверхности волокон).

ПВНМ-1 представляет собой полимерный нетканый материал из полипропилена (рис. 2). Диаметр волокон матрицы варьирует от 5 до 15 мкм. Поверхность волокна гладкая. В поверхностном слое матрицы бактериальные клетки располагаются в зоне пересечения волокон (рис. 2, А). Наблюдаются как одиночно располагающиеся бактериальные клетки, так и разных размеров конгломераты клеток (рис. 2, Б). Морфология клеток однотипная: палочки 0,5 мкм и длиной 0,5—1,2 мкм. Бактерии погружены в толщу полимерного матрикса и плотно прилегают к поверхности полимерного волокна. Во внутреннем слое матрицы наблюдается равномерное распределение бактериальных клеток на поверхности волокон и образование небольших конгломератов (рис. 2, В). Морфотип клеток для поверхностного и внутреннего слоя матрицы сходен.

На ПВНМ-2 расположены одиночные бактериальные клетки и небольшие кластеры, погруженные в биополимерный матрикс. Выявляется частичная интрузия (внедрение) клеток бактерий в волокна матрицы на основе полиэфира (рис. 3, А). На рис. 3, Б

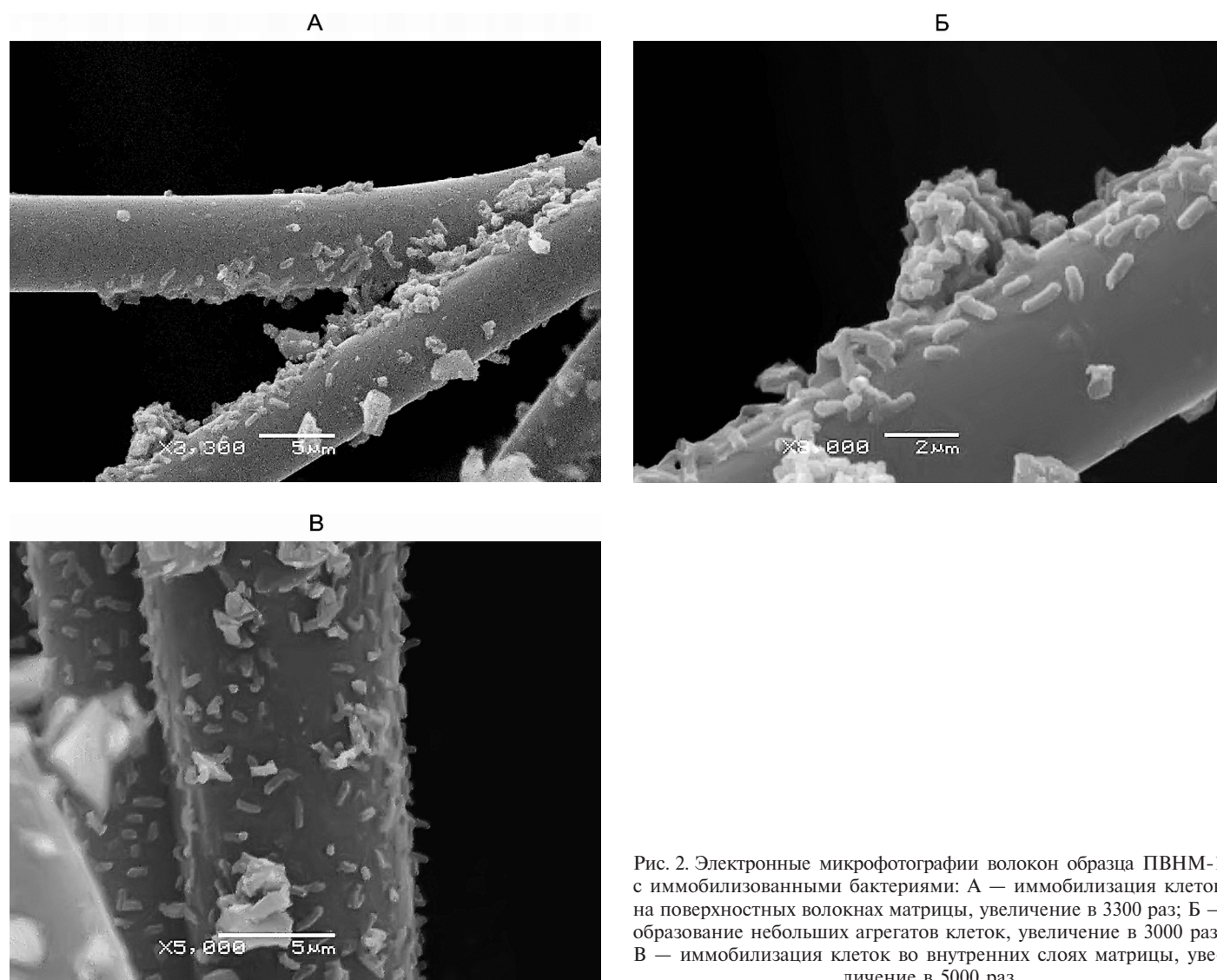


Рис. 2. Электронные микрофотографии волокон образца ПВНМ-1 с иммобилизованными бактериями: А — иммобилизация клеток на поверхностных волокнах матрицы, увеличение в 3300 раз; Б — образование небольших агрегатов клеток, увеличение в 3000 раз; В — иммобилизация клеток во внутренних слоях матрицы, увеличение в 5000 раз

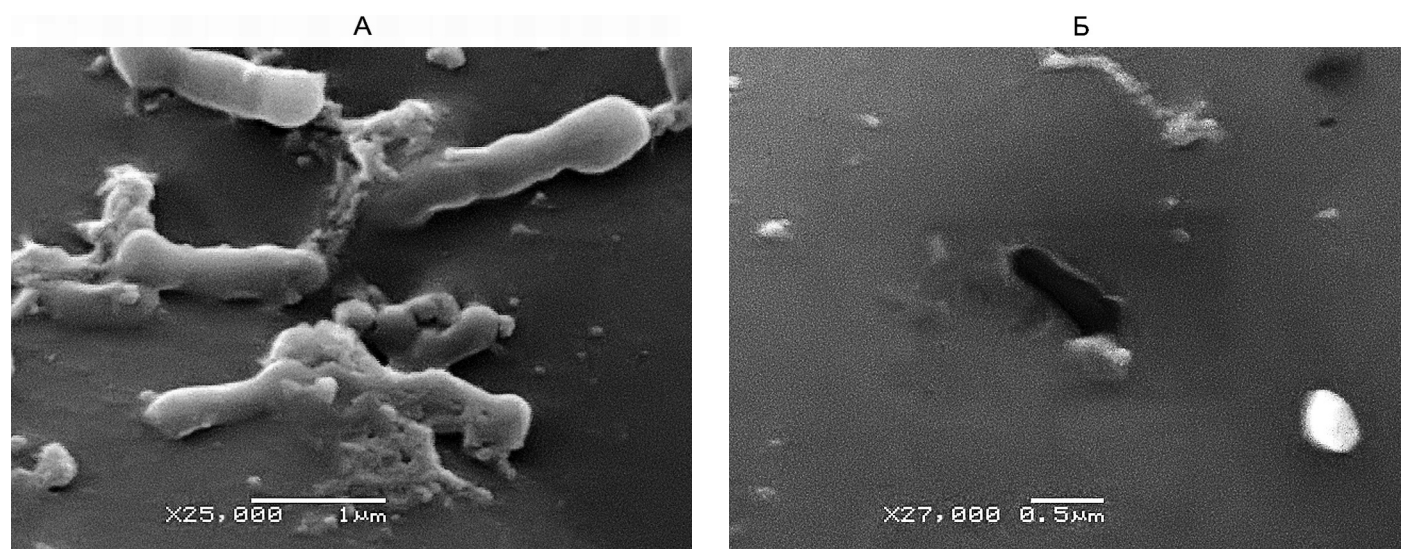


Рис. 3. Электронные микрофотографии волокон образца ПВНМ-2 с иммобилизованными бактериями: А — интрузия клеток в волокно матрицы; Б — место открепившейся с поверхности волокна бактерии в виде палочки

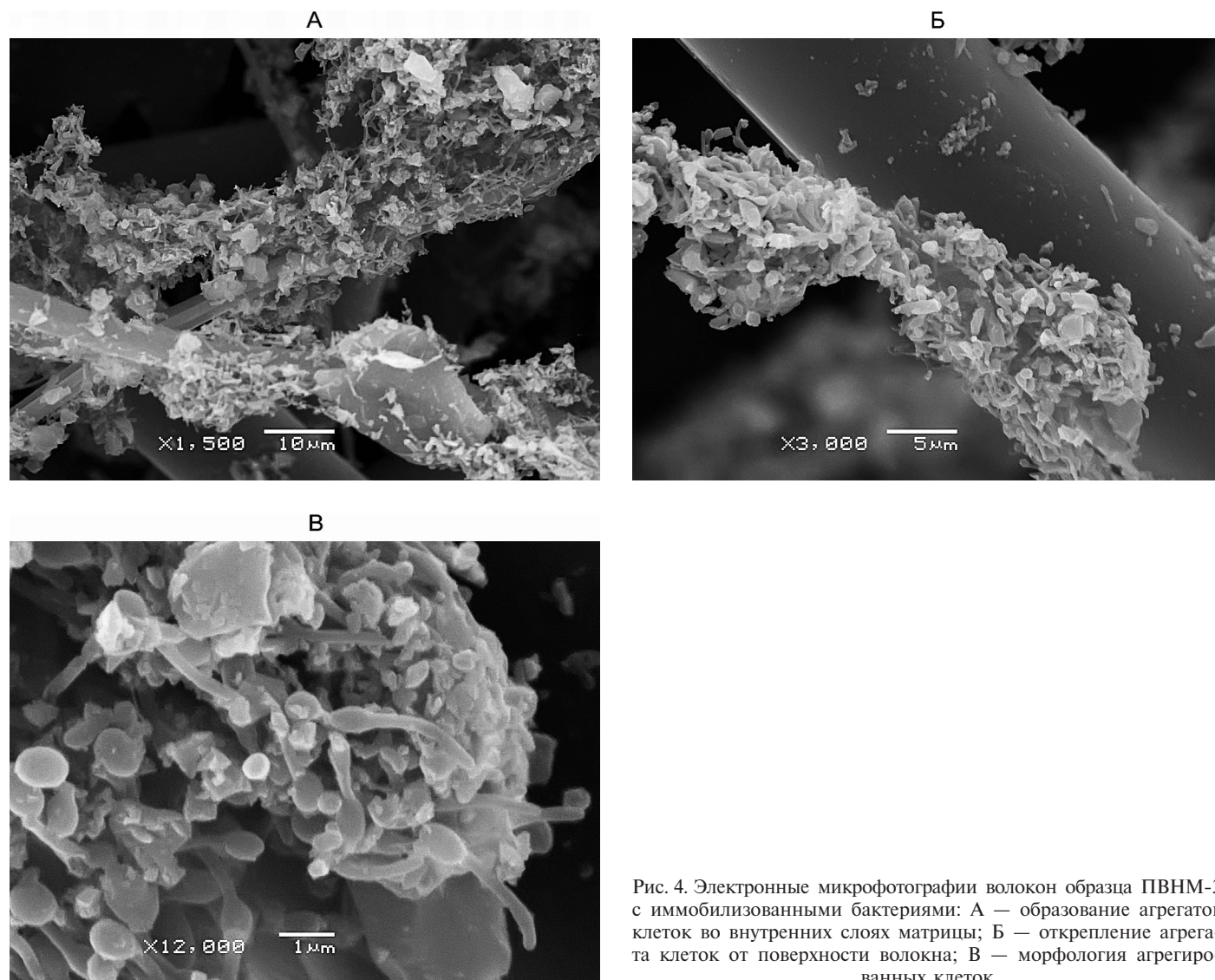


Рис. 4. Электронные микрофотографии волокон образца ПВНМ-3 с иммобилизованными бактериями: А — образование агрегатов клеток во внутренних слоях матрицы; Б — открепление агрегата клеток от поверхности волокна; В — морфология агрегированных клеток

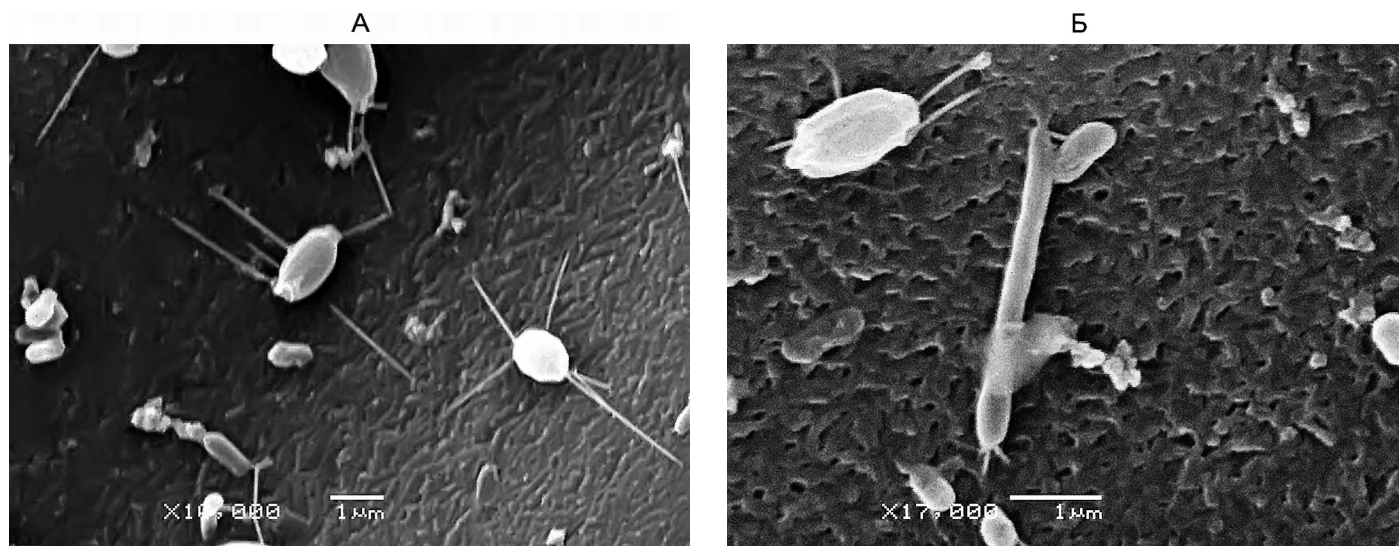


Рис. 5. Прикрепление бактериальных клеток к поверхности ПВНМ-3: А — прикрепление клеток с формой палочки; Б — прикрепление клеток веретеноподобной формы

показано место открепившейся с поверхности волокна бактериальной культуры.

Морфология клеток однотипная: палочки 0,5 мкм и длиной 0,5—1,2 мкм. На внешней поверхности матрицы количество бактериальных клеток меньше, чем во внутренних слоях. Это может быть связано с тем, что в БНД легко открепляются с поверхности матрицы.

Диаметр волокон ПВНМ-3 варьирует от 3 до 60 мкм, имеются волокна с гладкой поверхностью и волокна с глубокими продольными ложбинками. Клетки бактерий распределены на поверхностных волокнах матрицы равномерно. При иммобилизации в течение 2 сут распределение клеток на волокнах матрицы равномерно, встречаются как одиночные клетки, так и небольшие агрегаты. При увеличении времени культивирования до 5 сут во внутренних слоях матрицы наблюдается утолщение волокон за счет образования крупных агрегатов бактериальных клеток (рис. 4, А). Агрегаты клеток заполняют просветы между волокнами матрицы и могут неплотно прилегать к поверхности волокна. Крупные агрегаты могут открепляться с поверхности полимерного волокна (рис. 4, Б). Такие агрегаты образованы бактериальными клетками следующих морфотипов: палочки толщиной 0,5 мкм и длиной 2,0—4,0 мкм с утолщением на конце, мелкие кокки $0,3 \times 0,3$ мкм, $0,5 \times 0,5$ мкм, крупные кокки $1,0 \times 1,0$ мкм. Процесс прикрепления бактериальных клеток к поверхности матрицы сопровождается выделением слизистого матрикса сетчато-губчатой структуры.

Бактерии рода *Rhodococcus* являются основным компонентом изученной ассоциации. Известно, что они имеют мощную липофильную стенку, обладающую высоким сродством к гидрофобному субстрату [9].

Считается, что потенциальными факторами адгезии родококков являются гидрофобная клеточная

стенка, поверхностные выросты и экзополисахариды [10]. Из данных по ультраструктуре и морфологии клеток родококков известно, что в адгезии и кооперации их клеток друг с другом, формировании колоний участвуют пептидогликановые слои клеточной стенки, а также пилевидные поверхностные тяжи и множественные шишковидные и шиповидные выросты клеточной поверхности [9, 11]. ПВНМ-3 имеет неровную поверхность, значительное количество впадин и бугорков, а также характеризуется наличием мелких пор размером 20—70 нм. При иммобилизации на ПВНМ-3 наблюдалось образование клетками пилевидных тяжей, структур, способствующих прочному закреплению БНД на поверхности матриц. Образование пилевидных тяжей наблюдалось как у клеток с веретеноподобной формой (длина тяжей 1—3 мкм) (рис. 5, А), так и у клеток в виде длинных палочек (длина тяжа 0,3 мкм) (рис. 5, Б).

Таким образом, при изучении взаимодействия полимерных материалов различной химической природы и модельной ассоциации бактерий-нефтедеструкторов был показан активный характер прикрепления клеток. Иммобилизация бактерий на полимерных материалах осуществлялась путем интрузии бактериальных клеток в волокна ПВНМ-2, выделения внеклеточного полимерного матрикса на волокнах ПВНМ-1, с образованием пилевидных тяжей и полимерного матрикса на волокнах ПВНМ-3. Были отмечены специфичность морфологии бактериальных клеток ассоциации и присутствие на поверхности волокон активно делящихся бактериальных клеток, приводящих к образованию крупных клеточных кластеров.

* * *

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки (грант № 16.513.12.3028).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мерициди И.А. Техника и технология локализации и ликвидации аварийных разливов нефти и нефтепродуктов. СПб.: НПО "Профессионал", 2008. 824 с.
2. Корженевская Т.Г. Роль микроорганизмов в преобразовании состава нефти и нефтяных биотехнологиях. М.: Геоинформцентр, 2002. 76 с.
3. Арене В.Ж., Гридин О.М. Эффективные сорбенты для ликвидации нефтяных разливов // Экология и промышленность России. 1997. № 2. С. 102—110.
4. Квасников Е.И., Ключникова Т.М. Микроорганизмы — деструкторы нефти в водных бассейнах. Киев: Наукова Думка, 1981. 130 с.
5. Киреева Н.А. Влияние биоремедиации на условно-патогенные микромицеты нефтезагрязненных почв // Проблемы медицинской микологии. 2005. Т. 7. № 2. С. 40—41.
6. Omarova E.O., Lobakova E.S., Dolnikova G.A., Nekrasova V.V., Idiatulov R.K., Kashcheeva P.B., Perevertailo N.G., Dedov A.G. Immobilization of bacteria on polymer matrices for degradation of crude oil and oil products // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2012. Vol. 67. N 1. P. 24—31.
7. Выдрякова Г.А., Выдрякова Г.А., Кирпиченко Т.В., Лифантьева А.А. Формирование агрегированных структур светящимися бактериями в присутствии углеводов // Микробиология. 2007. Т. 76. № 2. С. 282—284.
8. Гвоздяк П.И. Имобилизованные микроорганизмы в очистке сточных вод от ксенобиотиков // Имобилизованные клетки в биотехнологии. Пушкино, 1987. С. 56—62.
9. Коронелли Т.В. Липиды миксобактерий и родственных микроорганизмов. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1984. 158 с.
10. Коронелли Т.В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводов в окружающей среде (обзор) // Прикл. биохим. и микробиол. 1996. Т. 32. № 6. С. 579—585.
11. Коронелли Т.В. Углеводородокисляющие микроорганизмы арктических вод и льдов // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1989. № 4. С. 581—587.

Поступила в редакцию
15.05.13

THE INVESTIGATION OF IMMOBILIZATION OF BACTERIA ASSOCIATION ON DIFFERENT POLIMERIC MATERIALS

E.S. Lobakova, S.G. Vasilieva, G.A. Dolnikova, P.B. Kascheeva, A.G. Dedov

Nowadays the synthesized polymeric materials for oil degradation are widely used. The creation of systems which combines these materials with oil-degrading microorganisms gives the possibility to obtain the effective polyfunctional bio-hybrid materials. The investigation of polymeric material and microorganisms interaction was conducted using the scanning electron microscopy. The peculiarities of immobilization and bacteria morphology depending on different types of polymeric materials were investigated. For assessment of immobilization effectiveness the adsorption dynamics was studied.

Key words: *non-woven polymer materials, oil and petroleum products, bacteria, degradation, immobilization.*

Сведения об авторах

Лобакова Елена Сергеевна — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-38-07; e-mail: elena.lobakova@rambler.ru

Васильева Светлана Геннадьевна — науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-43-10.

Дольникова Галина Александровна — науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-43-10.

Кашеева Полина Борисовна — аспирант, РГУ нефти и газа им. И.М. Губкина. Тел.: 8-499-135-84-36; e-mail: polinab@list.ru

Дедов Алексей Георгиевич — докт. хим. наук, зав. кафедрой, РГУ нефти и газа им. И.М. Губкина. Тел.: 8-499-135-84-36; e-mail: dedov.a@mail.ru