

Н.Ю. Клименко, И.В. Сиора, Е.А. Новикова, А.П. Головань,  
Т.В. Крупская, В.В. Туров

## СВОЙСТВА МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ ВОДЫ НА ОСНОВЕ НАНОКРЕМНЕЗЕМА

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины  
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина, E-mail: nklymenko@ukr.net*

*Показано, что присутствие смеси гидрофильного и гидрофобного нанокремнеземов повышает жизнедеятельность дрожжевых клеток в отсутствие питательной среды. Исследовано влияние дополнительного внесения минеральных веществ и pH среды на интенсивность роста и метаболизм суспензии дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*, а также их способность утилизировать углеводороды моторного масла. Полученные экспериментальные данные являются основой для разработки новых эффективных методов очистки воды и почв от загрязнений разными углеводородами.*

**Ключевые слова:** *нанокомпозит, нанокремнезем, дрожжевые клетки, минеральные вещества, деструкция углеводородов, очистка воды*

### ВВЕДЕНИЕ

Проблема очистки окружающей среды от нефтяного загрязнения на сегодняшний день приобретает все большую актуальность [1]. Из многочисленных методов, которые позволяют уменьшить концентрацию нефти и нефтепродуктов в экосистемах, наиболее перспективными являются биологические методы (биоремедиация). Они основаны на естественных процессах разложения нефтепродуктов с помощью углеродоксилирующих микроорганизмов (бактерий и грибов), использующих углеводороды нефтепродуктов в качестве источника углерода и трансформирующих токсичные продукты до углекислого газа и воды [2]. Преимуществами биоремедиации являются: экологическая чистота, высокая рентабельность, отсутствие вторичного загрязнения, минимальные затраты.

Технология биоремедиации предполагает использование аборигенной или привнесенной микрофлоры для самоочистки нефтезагрязненных территорий. Внесение в почву биопрепаратов с определенной культурой микроорганизмов увеличивает их численность и повышает эффективность процесса очистки. Данные препараты могут применяться в виде водной суспензии микроорганизмов, обезвоженной микробной

биомассы, иммобилизованных на твердом носителе клеток бактерий и (или) грибов [3]. Инкапсулированные в матрицу сорбента клетки удерживаются в районе локального загрязнения, сохраняя оптимальную концентрацию и защищенность от воздействия негативных факторов окружающей среды, что позволяет продлить эксплуатацию клеток, по сравнению со свободными культурами [4].

Основной причиной высокой устойчивости нефти в окружающей среде является ограниченная растворимость в воде углеводородов. Такие соединения малодоступны для микроорганизмов и с трудом подвергаются биодеградации [1], поэтому одним из способов решения данной проблемы может быть использование гидрофобного сорбента. Перспективными сорбентами для сбора нефти и нефтепродуктов являются нанокремнеземы, обладающие рядом свойств: способностью адсорбировать микроорганизмы, высокой химической и биологической стойкостью, механической прочностью, а также возможностью придания удобных в технологическом отношении форм. Ранее нами создана модельная композитная система на основе смеси гидрофобного и гидрофильного кремнеземов и дрожжевых клеток *S. cerevisiae*, которая позволяет

проводить деструкцию углеводов в водной среде [5]. При этом было показано, что практически полная деструкция углеводородной пленки на поверхности воды осуществляется в течение двух месяцев.

Дрожжи широко распространены в природе и являются составной частью микроорганизмов водоемов и грунтов. Они обладают высокой биохимической активностью и способны окислять различные органические вещества. Применение дрожжевых клеток в биоремедиации обусловлено их генетической способностью использовать нефтяные углеводороды в качестве единственного источника углерода и энергии [6].

Целью работы было усовершенствование состава композитной системы путем введения в нее набора минеральных веществ, повышающих эффективность функционирования дрожжевых клеток *S.cerevisiae* на примере утилизации углеводов моторного масла, а также влияния на процесс ремедиации рН среды.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служила культура сухих хлебопекарских дрожжей *S. cerevisiae* производства ТМ «Премия» (Украина). Приготовление нанокompозита осуществляли при тщательном растирании смеси нанокремнеземов с соответствующей навеской дрожжей без большой механической нагрузки. Использование «сухого» метода формирования композитной системы было связано с высокой водопоглощающей способностью клеток дрожжей, которые должны оставаться в неактивном состоянии вплоть до помещения композита в водную среду. В работе использовали нанокремнеземы: гидрофильный (А-300) и гидрофобный (АМ1-300) производства Калушского опытно-экспериментального завода Института химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины в присутствии минеральных веществ (в %: KCl – 1.5, CuSO<sub>4</sub> – 0.3, ZnSO<sub>4</sub> – 0.4, (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO – 3.0, Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> – 0.35). Исходное соотношение А-300 и АМ1-300 составляло 1:1, а в присутствии минеральных веществ – 1:2. Ранее [7] установлено, что в составе нанокompозита оптимальным количеством

дрожжей является 50 % от общей массы, а соотношение гидрофильного и гидрофобного нанокремнеземов не оказывает существенного влияния на культивирование дрожжевых клеток. Однако в этом опыте для усовершенствования композита было увеличено количество дрожжей (с целью интенсификации разложения углеводов) и гидрофобного кремнезема (для более длительного удерживания клеток на поверхности воды).

Полученный нанокompозит равномерно распределяли по поверхности масляного пятна для имитации естественного процесса очистки водной среды от нефтезагрязнения. При этом дрожжевые клетки имели возможность взаимодействовать с моторным маслом. В дальнейшем, после начала процесса деструкции масляной пленки, часть нанокompозита вместе с продуктами разложения моторного масла проникала в объем раствора или оседала на дне.

Определение оптимальных условий роста биомассы дрожжей проводили при рН водной среды 4.0, 7.0 и 8.0. Необходимые значения рН устанавливали добавлением HCl или NaOH. Полученный нанокompозит засыпали в дистиллированную воду с соответствующим значением рН, содержащую моторное промыточное масло для двигателя «Pemco kuras» (Литва). Для определения биомассы дрожжей использовали колориметрический метод. Оптическую плотность суспензии определяли с помощью фотоколориметра КФК-2МП при длине волны 540 нм и длине оптического пути 0.5 см [8]. Образцы суспензии отбирали при помощи пипетки через закрепленные на стаканах полипропиленовые трубочки, что позволило исключить присутствие масла в пробе и способствовало поступлению кислорода в воду, поскольку масляная пленка этому препятствовала.

Определение жизнедеятельности дрожжевых клеток проводили путем измерения углекислого газа, выделившегося в процессе деструкции углеводов моторного масла. Для этого в колбу на 250 мл наливали 100 мл воды с определенным значением рН, добавляли моторное масло в концентрации 3 % (по объему) и навеску смеси нанокремнеземов с дрожжами (0.1 г) или чистые дрожжи (контроль) (0.075 г), что соответствовало

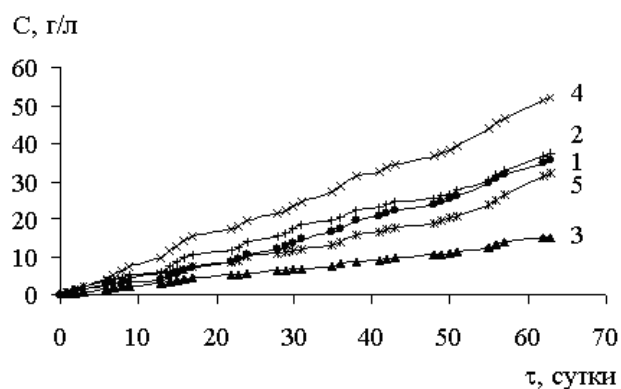
количеству дрожжей в нанокompозите. Колбу закрывали пробкой со вставленным в нее затвором. Во время исследования жизнедеятельности клеток в колбе накапливается углекислый газ, который выходит наружу через стеклянный затвор. Выделившийся углекислый газ определяли количественно. Для этого колбу с содержимым периодически взвешивали на технических весах с точностью до 0.01 г. Для получения достоверных результатов проводили несколько опытов и вычисляли среднее значение [9]. Колбы инкубировали в термостате при 35 °С.

Экспериментальные исследования влияния нанокремнеземов и рН среды на рост биомассы *S. cerevisiae* осуществляли ежедневно в течение 63 суток до уменьшения масляного пятна на водной поверхности.

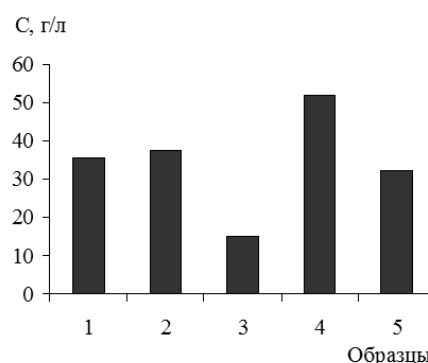
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Влияние минеральных веществ на газовыделение и рост биомассы дрожжевых

клеток показано на рис. 1 а. После инкубации в первые трое суток наблюдаются одинаковые значения газовыделения для всех опытных образцов. Это связано с периодом приспособления клеток к условиям новой среды. При культивировании дрожжей в колбах до 24 суток газовыделение увеличивается в присутствии минеральных веществ в 1.3 раза по сравнению с контролем. В то же время рост биомассы был практически одинаков для смеси нанокремнеземов без добавок и контроля. С 24 по 38 сутки наблюдается увеличение газовыделения и для смеси нанокремнеземов без добавок в 1.3 раза по сравнению с контролем. Однако присутствие минеральных добавок увеличивает рост дрожжей в 1.4 и в 1.2 раза, и смеси нанокремнеземов без добавок, соответственно. После 38 суток существенной разницы в накоплении биомассы клеток не наблюдается.



а



б

**Рис. 1.** Зависимость выделения углекислого газа суспензией дрожжевых клеток от рН среды (а) и диаграмма выделения CO<sub>2</sub> суспензией *S. cerevisiae* на 63 сутки (б) для исследуемых образцов: 1 – смесь нанокремнеземов (рН 7.0); 2 – смесь нанокремнеземов с минеральными веществами (рН 7.0); 3 – смесь нанокремнеземов с минеральными веществами (рН 4.0); 4 – смесь нанокремнеземов с минеральными веществами (рН 8.0); 5 – контроль (рН 7.0)

Подобное отличие указывает на стимулирующую роль минеральных веществ на метаболизм дрожжевых клеток. Калий, кальций, цинк и медь необходимы для хорошего роста и развития дрожжей [10]. Ионы калия способствуют ускорению процесса брожения, кальций стимулирует энергетический обмен, ионы цинка играют важную роль в углеводном, фосфорном и белковом обмене клеток. Медь принимает

участие в процессах брожения и вместе с другими микроэлементами повышает скорость размножения дрожжевых клеток. Стимулирующее действие микроэлементов объясняется тем, что они являются активаторами ряда ферментов и одновременно составной частью их молекулы.

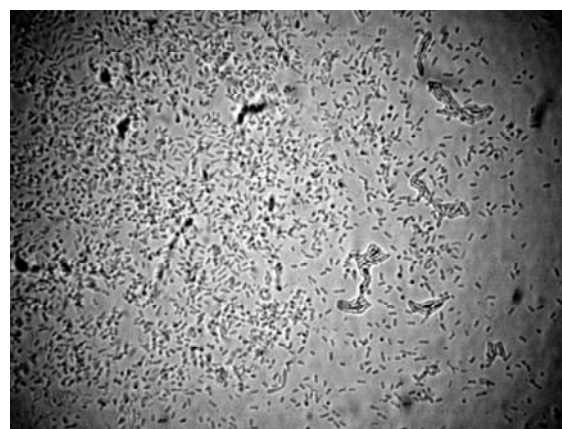
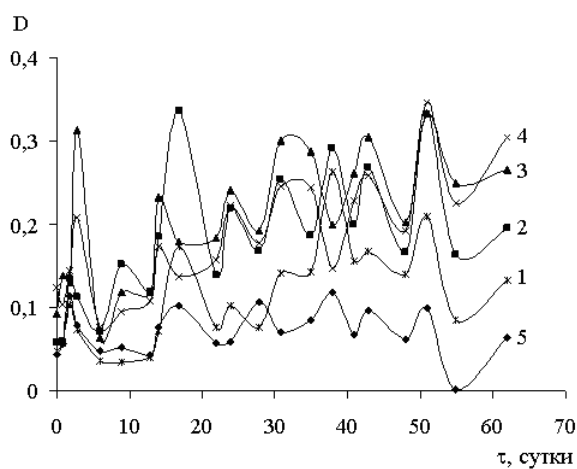
Поскольку лучший результат получен для смеси нанокремнезема в присутствии

минеральных веществ, по сравнению с чистой смесью, то для дальнейших исследований по влиянию рН среды на дрожжи выбран нанокompозит с минеральными веществами. Деструкцию моторного масла изучали в водной среде при значениях рН 4.0, 7.0 и 8.0. Установлено, что выделение углекислого газа дрожжевыми клетками при рН 4.0 в 2 раза меньше, а для рН 8.0 – в 1.5 – 2 раза больше, по сравнению с контролем (рис. 1 б). Отмечено, что газовыделение в щелочной области выше в 3.5 раза, чем в кислой среде, которая неблагоприятна для роста углеводород-окисляющих микроорганизмов, а значения рН, близкие к нейтральным, наоборот, являются оптимальными для их роста вследствие ионизации карбоксильных групп. Такой эффект объясняется тем, что при сдвиге рН в кислую или щелочную область, вероятнее всего, может измениться знак заряда поверхности клетки [11], что приведет к изменению прочности и проницаемости

клеточной стенки для различных молекул и ионов питательной среды, а следовательно, нарушится нормальный процесс обмена веществ.

Благодаря белковым системам и липидам, которые входят в состав мембран, обеспечивается контакт клетки с носителем, а также поглощение низкомолекулярных веществ и углеводов. Первичное взаимодействие нефтепродуктов с микроорганизмами происходит путем их непосредственного контакта. Поверхность дрожжевых клеток представляет собой сочетание полярных (гидрофильных) и неполярных (гидрофобных) участков. При росте дрожжей в среде с моторным маслом нерастворимые в воде углеводороды проникают в клетку через гидрофобные зоны в виде субмикроскопических капель [12].

Исследовано изменение прироста биомассы дрожжей от времени их культивирования в составе нанокompозита в присутствии моторного масла (рис. 2).



**Рис. 2.** Зависимость оптической плотности суспензии дрожжевых клеток от времени их культивирования и рН среды: 1 – смесь нанокремнезема (рН 7.0); 2 – смесь нанокремнезема с минеральными веществами (рН 7.0); 3 – смесь нанокремнезема с минеральными веществами (рН 4.0); 4 – смесь нанокремнезема с минеральными веществами (рН 8.0); 5 – контроль (рН 7.0) (а); микрофотографии бактерий, присутствующих во взвеси суспензии дрожжевых клеток при деструкции моторного масла (б)

Установлено, что первый максимум наблюдается для образцов в нейтральной среде на вторые сутки (кривые 1, 2, 5), в то время как для кислой (кривая 3) и щелочной (кривая 4) – на третьи сутки. Такое отличие можно объяснить тем, что дрожжам

необходимо более длительное время для приспособления к среде при сдвиге рН в кислую или щелочную область. Второй максимум фиксируется на 9 сутки для всех нанокompозитов, поскольку происходит изменение знака заряда поверхности клетки

[11]. На 14 сутки появляется третий максимум для образцов 3 и 4, а на 17 сутки – для образцов 1, 2, 5. В период с 22 суток и до конца эксперимента отмечено ряд максимумов, что отвечает бурному размножению бактерий, которые питаются продуктами метаболизма *S. cerevisiae* и разлагающимися клетками.

Прирост биомассы суспензии клеток *S. cerevisiae* визуально проявляется в виде помутнения растворов, а утилизация углеводов моторного масла – постепенной деструкцией масляной пленки на поверхности воды (рис. 3).

На протяжении эксперимента для всех образцов, в состав которых входят минеральные вещества, показатели прироста биомассы значительно выше, а именно от 1.7

до 3.3 раза, по сравнению с контролем и от 1.3 до 2 раз, по сравнению со смесью нанокремнезема без добавок (рис. 2). Это указывает на важную роль минеральных веществ в жизнедеятельности клеток в процессе деструкции ими моторного масла. Следует отметить, что наличие гидрофильного и гидрофобного нанокремнезема в составе нанокомпозита активизирует жизнедеятельность клеток и приводит к росту биомассы, по сравнению с контролем. Это обусловлено тем, что поверхность нанокремнезема повышает проницаемость клеточных мембран для питательных веществ и продуктов клеточного метаболизма, что хорошо согласуется с ранее полученными результатами работы [13].

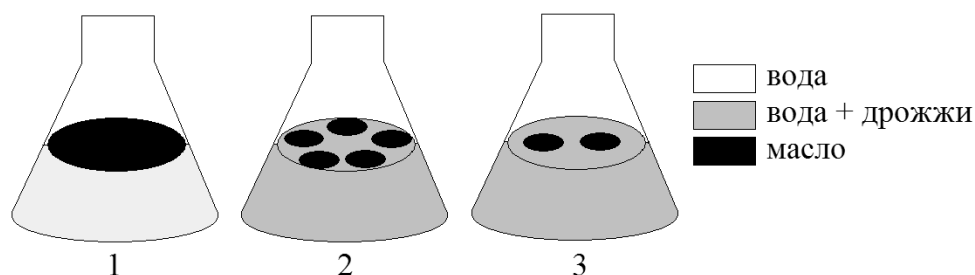


Рис. 3. Схематическое изображение деструкции углеводов моторного масла дрожжевыми клетками в водной среде на 63 сутки: 1 – контроль; 2 – смесь нанокремнезема; 3 – смесь нанокремнезема с минеральными веществами

## ВЫВОДЫ

Присутствие смеси гидрофильного и гидрофобного нанокремнезема в составе нанокомпозита способствует активированию процессов жизнедеятельности клеток *S. cerevisiae*. Внесение дополнительных источников минерального питания в нанокомпозит приводит к увеличению газовыделения дрожжевыми клетками в 1.4 и в 1.2 раза и прироста биомассы от 1.7 до 3.3 раза, по сравнению с контролем, и от 1.3 до 2 раз, по сравнению со смесью нанокремнезема без добавок. Установлено, что выделение углекислого газа суспензией

клеток *S. cerevisiae* при pH 4.0 в 2 раза меньше, а для pH 8.0 – в 1.5 – 2 раза больше, по сравнению с контролем. При этом, газовыделение в щелочной области выше в 3.5 раза, нежели в кислой.

Полученные экспериментальные данные являются основой для разработки новых эффективных методов очистки воды и почв от загрязнений моторным маслом. При внесении в нанокомпозит дополнительных минеральных веществ происходит более активный метаболизм в дрожжевых клетках, что способствует интенсивному разложению углеводов.

## Властивості модельних систем для біоремедіації води на основі нанокремнезему

Н.Ю. Клименко, І.В. Сіора, О.А. Новікова, А.П. Головань, Т.В. Крупська, В.В. Туров

Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України  
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна, nklymenko@ukr.net

Показано, що присутність суміші гідрофільного та гідрофобного нанокремнеземів підвищує життєдіяльність дріжджових клітин у відсутності поживного середовища. Досліджено вплив додаткового внесення мінеральних речовин та рН середовища на інтенсивність росту і метаболізм дріжджів *S. cerevisiae*, а також їхню здатність утилізувати вуглеводні моторного масла. Отримані експериментальні дані є основою для розробки нових ефективних методів очищення води і ґрунтів від забруднень різними вуглеводнями.

**Ключові слова:** наноккомпозит, нанокремнезем, дріжджові клітини, мінеральні речовини, деградація вуглеводнів, очищення води

## Properties of model systems based on nanosilica for water bioremediation

N.Y. Klymenko, I.V. Siora, E.A. Novikova, A.P. Golovan, T.V. Krupskaya, V.V. Turov

Chuiiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine  
17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine, nklymenko@ukr.net

The problem of environmental purification from petroleum pollution today is becoming increasingly topical. To solve this problem, the bioremediation way based on the processes of petroleum products decomposition by means of microorganisms that are capable to oxidize hydrocarbons is the most perspective method. The model composite system based on the mixture of nanosilica powders and *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells was created by us to destruct the petroleum products. The purpose of our investigation was to improve the composition of the composite by adding the mineral compounds (KCl – 1.5 %, CuSO<sub>4</sub> – 0.3 %, ZnSO<sub>4</sub> – 0.4 %, (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO – 3.0 %, Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> – 0.35 %) that can increase the efficiency of yeast cells in the destruction of motor oil hydrocarbons and to investigate the pH influence of aqueous media on the bioremediation. In this paper, it has been found that the presence of the mixture of hydrophilic (A-300) and hydrophobic (AM1-300) silicas increases vital activity of yeast cells without of nutrient medium. The results show when the additional source of mineral nutrition is added to the nanocomposite, the 1.4 to 1.2 times increase of yeast gas evolution as well as the 1.7 to 3.3 times biomass growth compared to the blank; and 1.3 to 2 times one compared to the mixture of nanosilica powders without additives was observed. The release of carbon dioxide gas by cells suspension at pH 4.0 was 2 times decreased and 1.5–2 times raised at pH 8.0 compared to the blank. Moreover, gas evolution in the alkaline medium was 3.5 times higher than that in the acidic one. It showed be noted that destruction of motor oil hydrocarbons can be visually observed as gradual destruction of the oil layer on the water surface. Consequently, the experimental results obtained during this research are crucial for the development of new effective methods of water and soil purification from the motor oil pollutants.

**Keywords:** nanocomposite, nanosilica, yeast cells, minerals, destruction of hydrocarbons, water purification

### ЛИТЕРАТУРА

1. Апендина Г.С., Науанова А.П., Абжалелов А.Б. Изучение параметров культивирования углеводородокисляющих микроорганизмов // Казахский национальный аграрный университет (исследования, результаты). – 2013. – Т. 3, № 4. – С. 15–22.
2. Тимергазина И.Ф., Переходова Л.С. К проблеме биологического окисления нефти и нефтепродуктов углеводородокисляющими микроорганизмами // Нефтегазовая геология. Теория и практика. – 2012. – Т. 7, № 1 – С. 1–28.

3. Водянова М.А., Хабарова Е.И., Донерьян Л.Г. Анализ существующих микробиологических препаратов, используемых для биодеградации нефти в почве // Горный информационно-аналитический бюллетень. – 2010. – № 7. – С. 253–258.
4. Жукова О.В., Морозов Н.В. Взаимодействие микроорганизмов с твердыми поверхностями – сорбентами при снятии локального нефтяного загрязнения // Вестник ТГГПУ. – 2010. – Т. 21, № 3. – С. 99–106.
5. Крупская Т.В., Сиора И.В., Клименко Н.Ю. и др. Моделирование композитной системы для ремедиации воды на основе нанокремнеземов и дрожжевых клеток // ДАН. – 2015. – № 10. – С. 55–63.
6. Миронов О.Г., Дорошенко Ю.В. Нефтеокисляющие дрожжи перифитона систем гидробиологической очистки морских вод // Морський екологічний журнал. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 58–62.
7. Клименко Н.Ю., Сиора И.В., Новикова Е.А. и др. Деструкция углеводородов в водной среде композитной системой на основе смеси нанокремнеземов и дрожжевых клеток // Химия и технология воды. – 2017. – Т. 39, № 4. – С. 352–359.
8. Цимберг Е.А., Титова Л.В., Курдиш И.К. Влияние высокодисперсных материалов на рост дрожжей рода *Candida* // Микробиологический журнал. – 1991. – Т. 53, № 4. – С. 55–58.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия. – Москва: Высшая школа, 1990. – 352 с.
10. Берри Д. Биология дрожжей. – Москва: Мир, 1985. – 96 с.
11. Пирт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – Москва: Мир, 1978. – 331 с.
12. Тажибаяева С.М., Мусабеков К.Б., Оразымбетова А.Б., Жубанова А.А. Поверхностные свойства дрожжевых клеток // Коллоидный журнал. – 2003. – Т. 65, № 2. – С. 132–135.
13. Крупская Т.В., Гунько В.М., Барвинченко В.Н. и др. Взаимодействие кремнезема с клеточной поверхностью дрожжей и состояние межфазной воды в зоне их контакта // Укр. хим. журн. – 2008. – Т. 74, № 2. – С. 84–91.

#### REFERENCES

1. Apendina G.S., Nauanova A.P., Abzhalelov A.B. The study of cultivation parameters hydrocarbon oxidizing microorganisms. *Kazakh National Agrarian University (researches, results)*. 2013. **3**(4): 152. [in Russian].
2. Timergazina I.F., Perekhodova L.S. Biological oxidation of oil and petroleum products using hydrocarbon-oxidizing microorganisms. *Oil and gas geology. Theory and practice*. 2012. **7**(1): 1. [in Russian].
3. Vodyanova M.A., Khabarova E.I., Doneryan L.G. Analysis existing of microbiological drugs used for biodegradation of oil in the soil. *Mountain information-analytical bulletin*. 2010. **7**: 253. [in Russian].
4. Zhukova O.V., Morozov N.V. The interaction of microorganisms with firm surfaces in the process of cleaning of the local oil pollution. *Bulletin of TGPU*. 2010. **21**(3): 99. [in Russian].
5. Krupskaya T.V., Siora I.V., Klymenko N.Y., Novikova E.A., Golovan A.P., Suvorova L.A., Turov V.V. Modeling composite system for remediation of water on based nanosilica and yeast cells. *Reports of the National Academy of Sciences*. 2015. **10**: 55. [in Russian].
6. Mironov O.G., Doroshenko J.V. The oil-oxidasing yeast in periphyton of system of hydrobiological cleaning of matine waters. *Morskyy ekolohichmyy zhurnal*. 2007. **6**(2): 58. [in Russian].
7. Klymenko N.Y., Siora I.V., Novikova E.A., Golovan A.P., Krupskaya T.V., Suvorova L.A., Turov V.V. Destruction of hydrocarbons in aqueous medium of composite system based on mixed of nanosilicas and yeast cells. *J. Water Chem. Technol*. 2017. **39**(4): 352. [in Russian].
8. Tsimberg E.A., Titova L.V., Kurdish I.K. Effect of highly-dispersed materials on the growth of *Candida* yeast. *Microbiol. J*. 1991. **53**(4): 55. [in Russian].
9. Lakin G.F. *Biometrics*. (Moscow: Vishcha shkola, 1990). [in Russian].
10. Berry D.R. *The biology of yeasts*. (London: Edward Arnold, 1985).
11. Pirt S.J. *Principles of microbe and cell cultivation*. (Oxford, London, Edinburgh, Melbourne: Blackwell Scientific Publications, 1978).
12. Tazhibayeva S.M., Musabekov K.B., Orazymbetova A.B., Zhubanova A.A. Surface properties of yeast cells. *Colloid J*. 2003. **65**(2): 132. [in Russian].
13. Krupskaya T.V., Gun'ko V.M., Barvinchenko V.N., Turov V.V., Shulga O.V. Interaction of silica particles with cellular surface and state of interfacial water in area of contact. *Ukr. Chem. J*. 2008. **74**(2): 84. [in Russian].

Поступила 01.12.2016, принята 18.04.2017