

## Особенности жизнедеятельности искусственной биосистемы на основе сорбционных материалов

Лейкин Ю.А., Черкасова Т.А., Смагина Н.А., Елинек А.В.

*Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва*

Поступила 21.05.2010 г.

### Аннотация

Установлены лимитирующие факторы эффективной работы биосистемы и определены оптимальные условия ее активности для нормального функционирования иммобилизованных микроорганизмов в пористой структуре сорбентов. Показано, что кинетические зависимости процесса биодеструкции на биосорбентах подчиняются уравнению Михаэлиса-Ментен. Определены константы Михаэлиса и величины  $v_{max}$ . Результаты исследования биосорбционных процессов на реальной сточной воде автомойки адекватны результатам исследований, проведенных на модельной эмульсии.

**Ключевые слова:** сорбция, биодеструкция, микроорганизмы, биосорбенты, кинетические зависимости

Limiting factors of effective employment of biosystem were established and optimal conditions of its activity for the proper functioning of immobilized microorganisms in the porous structure of sorbents were determined. It is shown that the kinetic dependences of process of biodegradation by the biosorbents obey Michaelis-Menten equation. The constants of Michaelis and  $v_{max}$  values were determined. The results of the study of biosorption processes on a real carwash wastewater are adequate to those conducted on a model emulsion

**Keywords:** sorption, biodegradation, microorganisms, biosorbents, kinetic dependences

### Введение

Сорбционные и биохимические методы очистки воды от нефтяных углеводородов (НУ) являются наиболее эффективными, однако, в отдельности каждый из них имеет свои недостатки. Для биохимических методов характерно падение скоростей и глубины очистки при малых концентрациях НУ в водной фазе, для сорбционных методов при больших концентрациях НУ возникают технико-экономические проблемы с частотой и глубиной регенерации твердофазного сорбента. Имеется множество разработок, основанных на использовании иммобилизованных на твердых носителях нефтеокисляющих микроорганизмов, для удаления НУ с поверхности воды. Однако фазовое многообразие нефтяных загрязнений ставит более сложные задачи в очистке воды от НУ. Несомненно, актуальным является разработка и исследование искусственных жизнеспособных биосистем на основе сорбционных материалов, способных на порядки выше концентрировать и растворенные, и эмульгированные НУ в твердой фазе.

Причем исходные угольные или полимерные сорбенты выполняют одну из основных функций биосистемы – доставка и концентрирование биогенных компонентов из жидкой внешней в твердую фазу с биокомпонентом, который обеспечивает саморегенерацию сорбентов, снижение концентраций в твердой фазе за счет эффективной биодеградациии НУ. Таким образом, для биосорбента

поддерживается высокая извлекающая способность и большие величины коэффициентов распределения, характерные для малых равновесных концентраций в твердой и жидкой фазах. При этом биодеструкция сконцентрированных НУ нефтеокисляющей микрофлорой, иммобилизованной в твердой фазе, обеспечивает синхронность эффекта саморегенерации сорбента [1,2].

## Теоретическая часть

В комплексе процессов самоочищения водоемов ведущее место принадлежит биологическим факторам, решающую роль среди которых играют нефтеокисляющие микроорганизмы [3, 4]. Однако не существует какого-либо одного микроорганизма, способного разрушить все разновидности нефтяных углеводородов. Бактериальное воздействие характеризуется высокой селективностью, и полное разложение всех компонентов нефти требует воздействия различных видов бактерий. При этом образуется ряд промежуточных продуктов, для разрушения которых требуются свои организмы.

Контактируя с органическими веществами, микроорганизмы частично разрушают их, превращая в воду, диоксид углерода, нитрит- и сульфат-ионы и т.д., другая часть вещества идет на образование биомассы. Разрушение органических веществ называют биохимическим окислением. [5]. К поверхности клеток вещества поступают за счет конвективной и молекулярной диффузии, а внутрь клеток – диффузией через полупроницаемые цитоплазматические мембраны, возникающей вследствие разности концентраций веществ в клетке и вне ее. Однако большая часть вещества попадает внутрь клеток при помощи специфического белка–переносчика. Образующийся растворимый комплекс «вещество–переносчик» диффундирует через мембрану в клетку, где он распадается, и белок–переносчик включается в новый цикл переноса [6].

В большинстве случаев разложение углеводорода начинается с окисления концевой метильной группы в первую спиртовую. Первичный спирт окисляется сначала до альдегида, затем до жирной кислоты, которая распадается путем включения в цикл  $\beta$  – окисления жирных кислот [3]. Для нормального функционирования иммобилизованных микроорганизмов в пористой структуре сорбентов, необходимо было установить лимитирующие факторы эффективной работы биосистемы и определить оптимальные условия ее активности.

## Эксперимент

### 1. Иммобилизация клеток *Pseudomonas* и *Rhodococcus* на сорбентах

Навески трех видов лиофилизированных (сухих) биопрепаратов (2 штамма *Pseudomonas fluorescens* и 1 штамм *Rhodococcus erythropolis*) в количестве 0,1 г каждого вносили в конические колбы, содержащие 100 см<sup>3</sup> приготовленного калий фосфатного буфера с питательной средой и 2-мя мл додекана (ДД) Концентрация приготовленной суспензии по клеткам составляла 3 г/л, значение рН находилось в пределах 7,0÷7,2. Затем в каждую колбу с суспензией клеток вносили 0,35÷0,40 г сорбента (нетканые материалы на основе полипропилена или сополимера акрилонитрила и ДВБ, а также вермикулит марки «Версойл») и инкубировали в термостате при температуре 29 °С в течение 48 часов, периодически помешивая. После чего, на фильтре отделяли биосорбент от жидкой фазы и ополаскивали тремя

порциями дистиллированной воды по 10 см<sup>3</sup>.

## 2. Проведение биодеструкции

В плоскодонную колбу вносили 100 мл водной эмульсии додекана или другой очищаемой от НУ воды, корректировали 0,1 н NaOH значение pH до 9,0 и помещали в нее подготовленного по п.1 биосорбента. Через определенные промежутки времени биодеструкции в жидкой фазе определяли pH и анализировали ее на содержание НУ. Колбы закрывали биологическими пробками с тем, чтобы был доступен воздух, т.к. процесс осуществляют в аэробных условиях. Процесс биодеструкции проводили в течение заданного времени при температуре 20÷22 °С при постоянном перемешивании. После определенного времени деструкции жидкую фазу отделяли от биосорбента декантацией и анализировали её на содержание нефтяных углеводородов, используя гравиметрический метод определения или метод ИК-спектроскопии.

## 3. Исследование биосорбента на основе вермикулита марки «Версойл» в трех циклах

Навеску подготовленного по п. 1 биосорбента «Версойл» (0,35 г) в воздушно сухом состоянии помещали в 100 см<sup>3</sup> свежеприготовленной эмульсии ДД с концентрацией 100 мг/дм<sup>3</sup> и выдерживали систему в течение 1, 2, 3, 4, 5 суток, что составляло время одного цикла. Отработавший в цикле биосорбент отделяли от жидкой фазы декантацией, промывали порцией дистиллированной воды, сушили фильтровальной бумагой и количественно переносили в свежеприготовленную порцию эмульсии с концентрацией 100 мг/дм<sup>3</sup> для следующего цикла извлечения ДД. Итого одна порция биосорбента отработывала 3 цикла по 5 суток (360 ч). Жидкую фазу после разделения с сорбентом анализировали на содержание остаточного количества ДД.

## **Обсуждение результатов**

Ферментная система выбранных микроорганизмов–деструкторов представлена каталазами, оксигеназами и уреазамы. Эти ферменты ответственны за каскад биохимических превращений, приводящий к образованию жирных кислот из соответствующих углеводородов, которые в дальнейшем распадаются путем включения их в цикл β–окисления жирных кислот и, следовательно эффективность биохимического окисления НУ биосорбентами будет определяться ферментативной активностью микроорганизмов в твердой фазе биосорбента, которую оценивали по удельной скорости биодеструкции нефтяных углеводородов ( $v_{y\partial}$  в мг НУ на 1 г биосорбента в час), характеризующей эффективность процесса:

$$v_{y\partial} = (C_0 - C_t) \cdot \frac{V}{g \cdot t} \quad \left[ \frac{\text{мг}}{\text{г} \cdot \text{ч}} \right]$$

где  $C_t$  – концентрация НУ для времени  $t$  (ч), мг/дм<sup>3</sup>;  $C_0$  – исходная концентрация НУ, г/дм<sup>3</sup>;  $V$  – объем жидкой фазы, дм<sup>3</sup>;  $g$  – навеска биосорбента, г;  $t$  – время биодеструкции, ч.

В табл. 1 приведены рассчитанные величины  $v_{y\partial}$  для биосорбентов на основе нетканых материалов: ПП (нейтрального) и АН-3 (содержащего в своей структуре группы первичного и вторичного амина), использованных в экспериментах на модельной эмульсии додекана и на сточной воде автомойки. На основании полученных расчетных данных были построены зависимости  $v_{y\partial}$  от  $t$  (рис. 1) для модельной эмульсии додекана (ДД) и для сточной воды (СВ). Приведенные на рис. 1 кинетические зависимости для биосорбентов на основе нетканых материалов

характеризуются практически одинаковой скоростью процесса, причем близки даже скорости для модельной эмульсии и сточной воды, полученные на нетканом сорбенте АН-3 с иммобилизованными клетками. Процессы биодеструкции зависят от сродства ферментов к субстрату (в нашем случае от нефтяных углеводов). При протекании ферментативных реакций в момент, когда происходит насыщение фермента, скорость реакции зависит только от концентрации фермента и не зависит от концентрации субстрата, т.е. будет лимитироваться количеством активных иммобилизованных клеток.

Таблица 1. Значения удельной скорости биодеструкции  $v_{уд}$  для нетканых материалов с иммобилизованными клетками

t, час	$v_{уд}$ , мг/(г·ч)		
	ПП-био эмульсия ДД*	АН-3 - био эмульсия ДД**	АН-3 - био сточная вода***
0,5	27.5	23.5	18.5
1	14.5	13.3	12.8
2	7.8	8.8	6.8
4	4.6	4.7	3.6
6	3.1	3.2	2.5
24	0.8	0.9	0.7

\* - исходная концентрация эмульсии додекана 89 мг/дм<sup>3</sup>, объем эмульсии 0,1 дм<sup>3</sup>; навеска ПП = 0,4 г; 20 ÷ 22 °С; рН<sub>исх.</sub> = 8,9; \*\* - исходная концентрация эмульсии додекана 91 мг/дм<sup>3</sup>, объем эмульсии 0,1 дм<sup>3</sup>; навеска АН-3 = 0,4 г; 20 ÷ 22 °С; рН<sub>исх.</sub> = 8,6; \*\*\* - исходная концентрация нефтяных углеводов в сточной воде автомойки 74 мг/дм<sup>3</sup>, объем эмульсии 0,1 дм<sup>3</sup>; навеска АН-3 = 0,4 г; 20 ÷ 22 °С; рН<sub>исх.</sub> = 9,02.

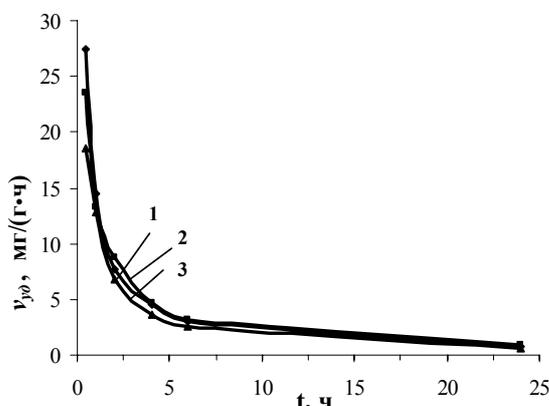


Рис. 1. Зависимости удельной скорости биодеструкции от времени для биосорбентов: 1 – ПП из эмульсии ДД; 2 – АН-3 из эмульсии ДД; 3 – АН-3 из СВ автомойки

Для оценки сродства фермента к субстрату и характеристики эффективности ферментативной реакции была использована модель Михаэлиса–Ментен [7], которая связывает удельную скорость процесса с заполнением субстратом активной поверхности сорбента. Уравнение модели позволяет рассчитать константу Михаэлиса ( $K_m$ ) и максимальную скорость ( $v_{max}$ ), достигаемую при насыщении фермента, когда все активные центры фермента заняты молекулами субстрата:

$$v = \frac{v_{\max}}{1 + K_m/[S]}$$

где:  $v$  – скорость реакции (мг/(г·час) при концентрации субстрата равной  $[S, \text{мг/дм}^3]$ ;  $v_{\max}$  – максимальная скорость (мг/(г·час), достигаемая при концентрации субстрата, достаточно высокой для насыщения фермента;  $K_m$  – константа Михаэлиса, численно равная концентрации субстрата (мг/дм<sup>3</sup>) в момент времени, когда скорость реакции достигает половины своего максимального значения.

Для удобства расчетов уравнение Михаэлиса–Ментен можно преобразовать так, чтобы экспериментальные точки лежали на прямой. Одним из таких графических преобразований является график в координатах Лайнуивера – Берка [8] по зависимости:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$

Для биосорбентов на основе нетканых материалов ионогенного АН-3 и нейтрального ПП обработка данных по модели Михаэлиса – Ментен в координатах Лайнуивера – Берка оказалась невозможной из-за отрицательности величины А – свободного члена уравнения Лайнуивера – Берка ( $1/v_{\max}$ ).

Далее мы использовали модель Михаэлиса – Ментен для описания процессов биодеструкции ДД на биосорбенте «Версойл» в 3-х последовательных циклах по 5 суток (360 ч). Условия эксперимента: исходная концентрация эмульсии додекана 100 мг/дм<sup>3</sup>, объем эмульсии 0,1 дм<sup>3</sup>; навеска вермикулита марки «Версойл» = 0,35 г; 20 ÷ 22 °С. Следует отметить, что экспериментальные кривые для 3 - х циклов практически сливаются в одну, и только лишь в координатах Лайнуивера – Берка (рис. 2) различие скоростей извлечения НУ в трех последовательных циклах становится заметным.

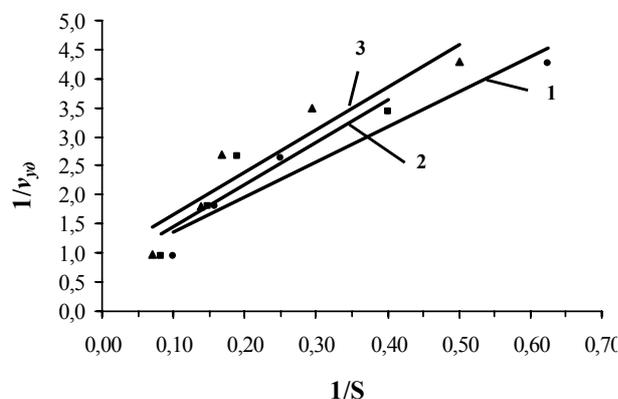


Рис. 2. Зависимость  $v_{уд}$  от  $[S]$  в координатах Лайнуивера – Берка для биосорбента «Версойл» в трех последовательных циклах:

1 – цикл I; 2 – цикл II; 3 – цикл III

Таблица 2. Значения удельной скорости биодеструкции  $v_{уд}$  мг/(г·ч) для «Версойла» с иммобилизованными клетками для 3-х циклов

$v_{уд}$ МГ/(Г·Ч) для циклов:	t, час :				
	24	48	72	96	120
I	1,07	0,56	0,38	0,29	0,23
II	1,05	0,55	0,38	0,29	0,23
III	1,02	0,55	0,37	0,29	0,23

Как видно из табл. 2, от цикла к циклу имеет место весьма четкое воспроизведение экспериментальных данных, несмотря на то, что образец сорбента после каждого цикла осушали и промывали порцией дистиллированной воды.

В табл. 3 приведены параметры уравнений Лайнуивера – Берка и рассчитанные величины  $v_{max}$  и  $K_m$  для биосорбента «Версойл» в трех последовательных циклах. При идентичных условиях эксперимента, концентрации субстрата и типе биосорбента можно ожидать схожести рассчитываемых констант ( $v_{max}$  и  $K_m$ ). Как видно из таблицы 3, величины, определяющие сродство ферментов к ДД, от цикла к циклу существенно не изменяются.

Таблица 3. Параметры уравнения Лайнуивера-Берка и рассчитанные величины  $v_{max}$  и  $K_m$  для биосорбента «Версойл» в трех последовательных циклах

ЦИКЛ	В	А	$\Gamma_{корр}$	$v_{max}$ , МГ/(Г·час)	$K_m$ , МГ/ДМ <sup>3</sup>
I	6,03	0,76	0,98	1,31	7,90
II	7,26	0,73	0,93	1,37	9,97
III	7,29	0,94	0,94	1,07	7,79
X <sub>средн</sub>				1,25	8,55
Ст. откл. <i>s</i>				0,16	1,23
$\delta$ , отн. %				12,9	14,4

Действительно,  $\Gamma_{корр}$  достаточно высоки, разброс данных невелик и вполне соответствует возможной погрешности эксперимента: для  $v_{max}$   $1,25 \pm 0,16$  мг/(г·час) или 12,9 отн. %, для  $K_m$   $8,55 \pm 1,23$  мг/дм<sup>3</sup> или 14,4 отн. %.

Зависимость удельных скоростей биодеструкции для того же биосорбента на основе «Версойла» при различных исходных концентрациях субстрата ( $C_0=50, 100, 200$  мг/дм<sup>3</sup>) представлены в таблице 4.

Таблица 4. Значения удельной скорости биодеструкции  $v_{уд}$  мг/(г·ч) для «Версойла» с иммобилизованными клетками для 3-х различных  $C_0$

Концентрации субстрата, мг/дм <sup>3</sup>	t, час :				
	24	48	72	96	120
50	0,51	0,26	0,18	0,14	0,12
100	1,07	0,56	0,38	0,29	0,23
200	2,31	1,17	0,78	0,59	0,47

Как видно, большие значения  $v_{уд}$  достигаются для высоких концентраций субстрата. Зависимостям  $v_{уд}$  от различных исходных концентраций субстрата, соответствуют различные линейные уравнения с высокими коэффициентами корреляции (без начального участка 0÷24 ч). Вместо ожидаемого постоянства хотя бы одной из констант обнаружен лишь меньший интервал их изменения: для  $v_{max}$   $1,31 \pm 0,7$  или 57,6 отн. %; для  $K_m$   $4,3 \pm 0,9$  или 21,8 отн. %.

## Заключение

Разработанные искусственные биосистемы способны создавать высокие концентрации нефтяных углеводородов в твердой фазе, необходимые для эффективного биологического окисления иммобилизованными микроорганизмами.

Показано, что скорость реакции зависит только от концентрации фермента и не зависит от концентрации субстрата, т.е. будет лимитироваться количеством активных иммобилизованных клеток. Кинетические зависимости процесса биодеструкции на биосорбентах подчиняются уравнению Михаэлиса-Ментен и определены константы Михаэлиса и величины  $v_{\max}$ . Результаты исследования биосорбционных процессов на реальной сточной воде автомойки адекватны результатам исследований, проведенных на модельной эмульсии.

### Список литературы

1. Лейкин Ю.А., Черкасова Т.А., Смагина Н.А. Саморегенерирующиеся сорбенты для очистки воды от нефтяных углеводородов // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. - Т.8. Вып.4 – С. 585 – 599.
2. Лейкин Ю.А., Черкасова Т.А., Смагина Н.А. Вермикулитовый сорбент для очистки воды от нефтяных углеводородов // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2009. - Т.9. Вып.1 – С. 104 – 117.
3. Квасников В.И., Ключникова Т.М. Микроорганизмы – деструкторы нефти в водных бассейнах. – Киев: Наукова думка, 1981. – 131с.
4. Миронов О.Г. Нефтеокисляющие микроорганизмы в море. – Киев: Наукова думка, 1971. – 234с.
5. Арнс В.Ж., Гридин О.М., Яншин А.Л. Нефтяные загрязнения: как решить проблему // Экология и промышленность России. – 1999, №9. – С. 33-36.
6. Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 567с.
7. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: 1982. Т.2. - 806с.
8. Крупяно В.И. К коррекции координат расчета констант ингибирования и активации ферментов. // Прикладная биохимия и микробиология. – 1995. – Т. 31. Вып.5. – С. 480 – 493.

**Лейкин Юрий Алексеевич** – д.х.н., профессор кафедры «Проблем устойчивого развития» (ПУР) Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева, Москва

**Черкасова Татьяна Александровна** – к.х.н., ведущий научный сотрудник Центра экотоксикометрии при ИПУР Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева, Москва

**Смагина Надежда Александровна** – аспирант кафедры «Проблем устойчивого развития» (ПУР) Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева, Москва

**Елинек Алексей Викторович** – к.т.н., старший научный сотрудник Центра экотоксикометрии при ИПУР Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева, Москва

**Leykin Yuriy A.** – Doctor of Chemistry Science, professor of Department Institute of Chemistry and the Problems of Sustainable Development of D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, e-mail: [leykinya@umail.ru](mailto:leykinya@umail.ru)

**Cherkasova Tatjana A.** – candidate of Chemistry Science, leading scientist of Centre ecotoxycometriy of Institute of Chemistry and Problems Sustainable Development of D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, e-mail: [tacherPUR@yandex.ru](mailto:tacherPUR@yandex.ru)

**Smagina Nadezhda A.** – postgraduate of the Problems Sustainable Development Department of D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow

**Elinek Aleksey V.** - candidate of Technichescich Science, senior scientist of Centre ecotoxycometriy of Institute of Chemistry and Problems Sustainable Development of D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow