

Т. В. Крупская, И. В. Сиора, Н. Ю. Клименко, Е. А. Новикова,
А. П. Головань, Л. А. Суворова,
член-корреспондент НАН Украины В. В. Туров

Моделирование композитной системы для ремедиации воды на основе нанокремнеземов и дрожжевых клеток

*Создана модельная композитная система на основе смеси гидрофобного (АМ1-300) и гидрофильного (А-300) кремнеземов, дрожжевых клеток, воды и п-декана. Исследовано влияние нанокремнеземов на интенсивность роста дрожжей рода *Saccharomyces cerevisiae*. Показано, что присутствие композита обеспечивает жизнедеятельность дрожжевых клеток даже в отсутствие питательной среды. Установлено, что малые концентрации смеси нанокремнеземов стимулируют рост биомассы клеток. Полученные результаты свидетельствуют о том, что созданный нанобиокомпозит является эффективным биодеструктором углеводов в водной среде.*

Ключевые слова: нанокремнезем, межфазные явления, очистка воды, дрожжевые клетки, деструкция углеводов.

Проблема очистки воды и земли от ее загрязнения нефтепродуктами с каждым годом становится все более актуальной. Наиболее перспективным в настоящее время является способ биоремедиации воды и почв, в основе которого лежит окисление нефтепродуктов микроорганизмами [1–4]. В настоящее время разработано много типов бактериальных препаратов, пригодных для широкого использования: серия биопрепаратов “Нафтокс” с бактериальной культурой на основе штамма *Pseudomonas citronelollis*, препараты Noggies NG20 (фирма Biodetox), Para-Vac (фирма Micro-Vac, США) и многие другие [5–7].

Исследования, проведенные в научных центрах Украины [8–10], показали, что нанодисперсные частицы могут оказывать на микроорганизмы стимулирующее влияние, во многом обусловленное формированием на границе клетка–частица прослойки воды с частично разрушенной сеткой водородных связей. Кроме того, нанодисперсные материалы, благодаря своей высокой адсорбционной способности по отношению к разным типам органических и неорганических соединений, могут служить носителями питательных веществ, обеспечивающих длительное функционирование бактериальных культур. Поэтому перспективным направлением улучшения эксплуатационных характеристик биодеструкторов углеводов может стать включение их в состав нанобиокомпозитной системы, созданной на основе клеточных культур, смеси нанокремнеземов с определенными гидрофобно-гидрофильными свойствами и сопутствующих веществ, обеспечивающих контакт компонентов композита с углеводородной и водной средами, позволяющих клеточным культурам приспосабливаться к окружающим условиям.

Цель работы — изучение возможности использования для окисления углеводов модельной системы, состоящей из дрожжевых клеток и взятых в равных количествах гидрофобного (АМ1–300) и гидрофильного (А-300) кремнеземов. Рассматривались вопросы жизнеспособности дрожжей после их контакта с нанокремнеземами в условиях малой и высокой гидратированности композитной системы, смачивания композита водой и отработан-

© Т. В. Крупская, И. В. Сиора, Н. Ю. Клименко, Е. А. Новикова, А. П. Головань, Л. А. Суворова, В. В. Туров, 2015

ным маслом двигателей внутреннего сгорания, а также состояние воды в нанокompозите, содержащем фиксированное количество воды и углеводорода (*n*-декана).

Материалы и методы исследования. Использовалась культура сухих хлебопекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) производства ТМ “Премия” (Украина). В процессе приготовления композита дрожжи (5 г) аккуратно растирались без большой механической нагрузки совместно с навеской смеси нанокремнезёмов (1 г) производства Калушского опытно-экспериментального завода Института химии поверхности им. А. А. Чуйко НАН Украины. Соотношение метилкремнезёма АМ1–300 и кремнезёма А-300 составляло 1 : 1. Затем к смеси дрожжей с нанокремнезёмом (1 г) добавляли дистиллированную воду (3 г) и *n*-декан (1 г), тщательно перемешивали до образования однородной массы. Такая композитная система легко может быть помещена в водную среду при полном смачивании как гидрофобных, так и гидрофильных ее компонентов. ЯМР-измерения проводились в стандартных 5 мм ампулах.

Микрофотографирование порошков и суспензий проводили с помощью микроскопа Primo Star (Carl Zeiss, Германия) при увеличении 400 и 1000 с использованием иммерсии.

ЯМР спектроскопия. Спектры ЯМР снимали на ЯМР-спектрометре высокого разрешения (Varian “Mercury”) с рабочей частотой 400 МГц. Использовали восемь 60° зондирующих импульсов длительностью 1 мкс при ширине полосы 20 кГц. Температура в датчике регулировалась термоприставкой Bruker VT-1000 с точностью ± 1 град. Интенсивность сигналов определялась путем измерения площади пиков с использованием процедуры разложения сигнала на его составляющие в предположении гауссовской формы сигнала и оптимизации нулевой линии и фазы с точностью, которая для хорошо разрешенных сигналов была не ниже 5%, а для перекрывающихся сигналов — $\pm 10\%$. Для предотвращения переохлаждения воды в исследуемых объектах измерения концентрации незамерзающей воды проводили при нагревании образцов, предварительно охлажденных до 210 К. Температурные зависимости интенсивности сигналов ЯМР проводили в автоматизированном цикле, когда время выдерживания образца при постоянной температуре составляло 9 мин, а время измерения 1 мин [11–13].

Результаты исследований и их обсуждение. Снятые при разных температурах спектры ^1H ЯМР композита, содержащего дрожжевые клетки, нанокремнезёмы, воду и *n*-декан, приведены на рис. 1, а. В спектрах регистрируются сигналы воды (более интенсивный сигнал) и *n*-декана. Поскольку количество воды составляет всего лишь 40% по массе от сухой массы дрожжей, вероятно, большая ее часть входит в состав внутриклеточной жидкости. С понижением температуры интенсивность сигналов воды и *n*-декана уменьшается за счет их частичного замерзания. Химический сдвиг протонов (δ_{H}) воды с уменьшением температуры увеличивается от $\delta_{\text{H}} = 4,8$ м.д. при $T = 283$ К до $\delta_{\text{H}} = 7$ м.д. при $T = 207$ К. Это связано с ростом упорядоченности водных полиассоциатов, входящих в состав внутриклеточных структур [12–14]. По степени ассоциированности воды, ответственной за этот сигнал, ее можно отнести к сильноассоциированной (SAW), в которой строение сетки водородных связей несколько более упорядочено, чем жидкой воды [13].

На рис. 1, б приведен график зависимости концентрации незамерзающей воды от температуры, а на рис. 1, в — построенное на его основе в соответствии с методикой, описанной в [12–14], распределение по радиусам кластеров внутриклеточной воды. Поскольку та часть воды, которая замерзает при $T < 265$ К, квалифицируется как сильносвязанная (SBW) [12–14], можно заключить, что слабосвязанной (WBW) является только 80 мг/г внутриклеточной воды. На распределении по радиусам кластеров связанной воды реги-

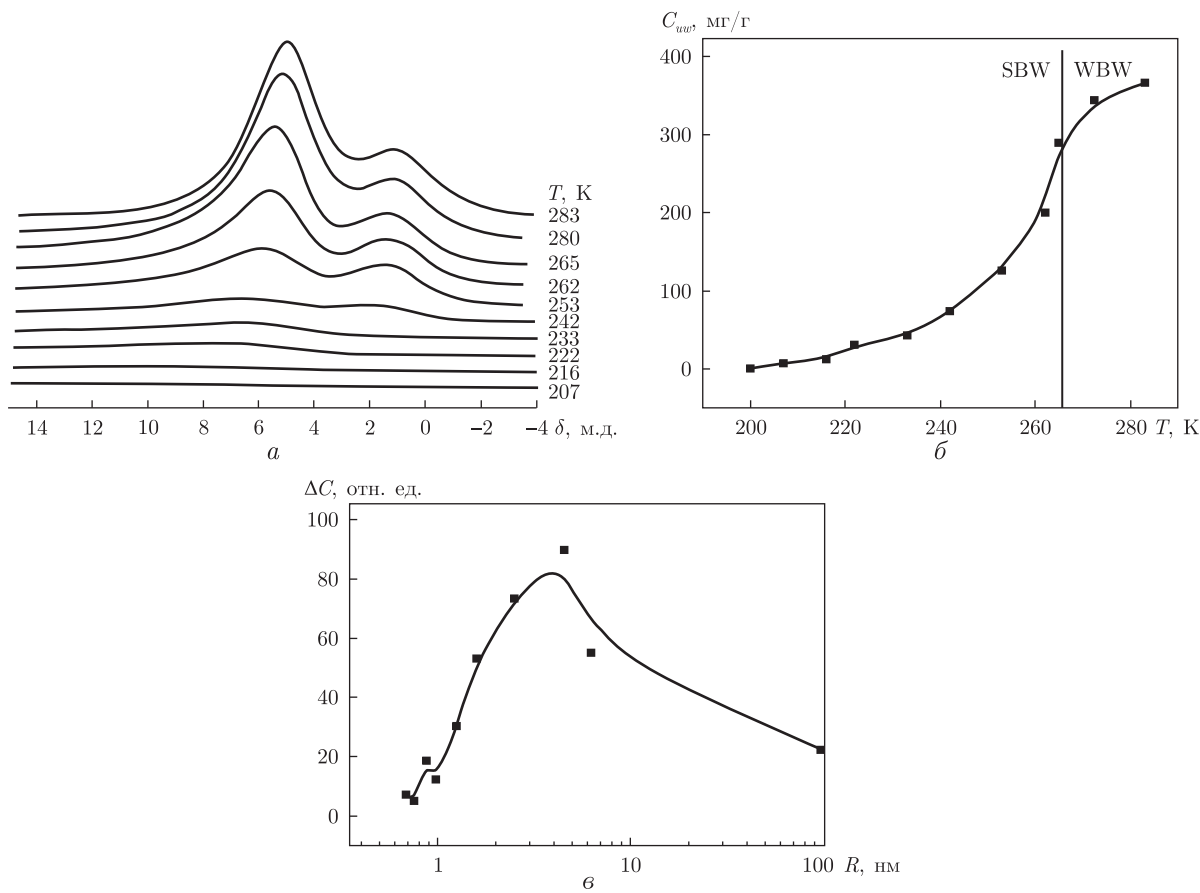


Рис. 1. Спектры ^1H ЯМР (а), температурные зависимости концентрации незамерзающей воды (б) и распределения по радиусам кластеров связанной воды (в) в композитной системе: дрожжевые клетки, нанокремнеземы, вода и n -декан

стрируется лишь один максимум при $R = 5$ нм. Учитывая понижение температуры замерзания межфазной воды, можно рассчитать ее изменения свободной энергии Гиббса. Тогда площадь, ограниченная графиком зависимости $\Delta G(C_{uw})$, будет определять межфазную энергию, т. е. суммарное понижение свободной энергии воды, обусловленное присутствием границ раздела фаз ($\gamma_s = 14$ Дж/г).

Микрофотографии композитной системы, содержащей дрожжевые клетки, смесь нанокремнезёмов, воду и n -декан, приведены на рис. 2. Композит представляет собой смесь конгломератов *S. cerevisiae* и частиц смеси кремнезёмов. На микрофотографиях клеточная и минеральные компоненты композита хорошо различимы (см. рис. 2, а). После выдерживания композита в течение 24 ч при 290 К наблюдаются клетки разного размера и цепочки клеток, образующиеся в результате их деления, хорошо видны новообразованные дочерние клетки (см. рис. 2, б, в). Следовательно, используемая при создании композита смесь нанокремнезёмов не только не убивает клетки дрожжей, но и обеспечивает возможность их деления даже в отсутствие естественной для выбранного типа дрожжевых клеток питательной среды (простых сахаров).

При добавлении небольшого количества воды композит легко формирует пленку без видимых признаков расслоения (см. рис. 2, г), в которой дрожжевые клетки приобретают

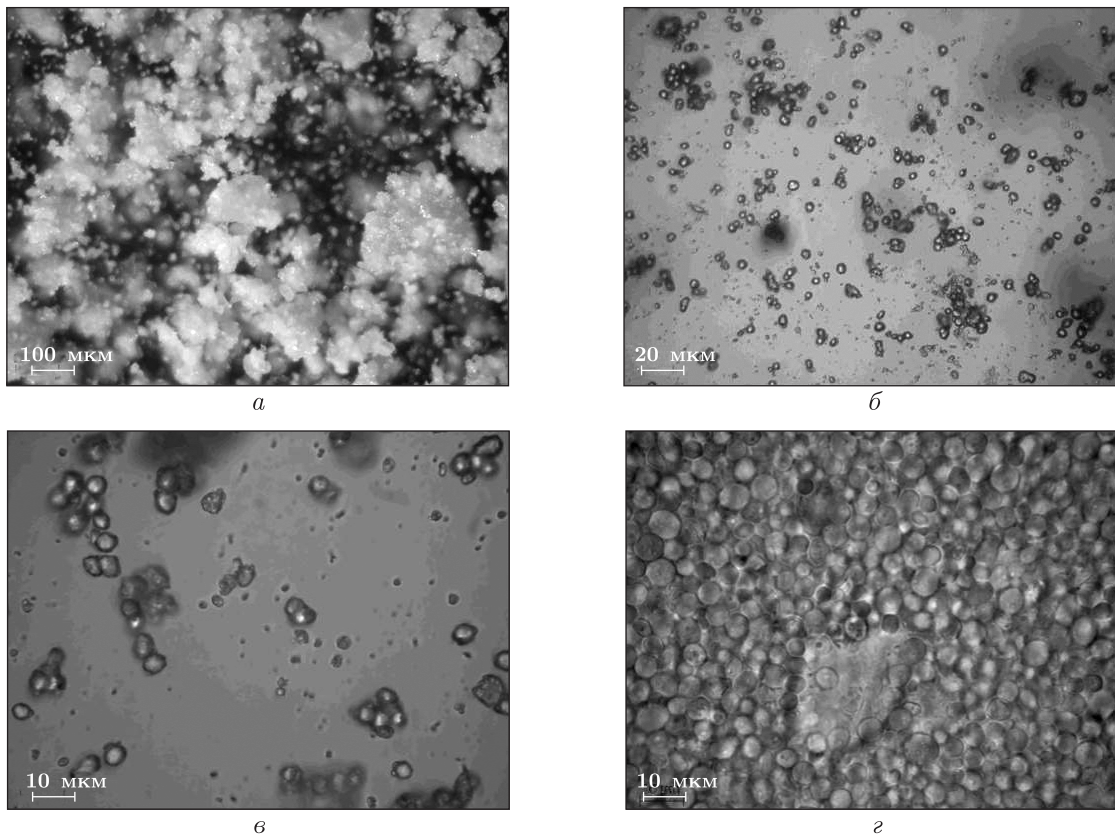


Рис. 2. Микрофотографии композитной системы, состоящей из клеток хлебопекарских дрожжей, инкапсулированных в смесь нанокремнезёмов АМ1-300 и А-300, содержащей 40% по массе воды и 15% по массе *n*-декана в режиме отражения $\times 100$ (а); тонкого слоя порошка в режиме пропускания $\times 400$ (б), $\times 1000$ (в) и смоченного водой $\times 1000$ (з)

почти сферическую форму, а частицы кремнезёма присутствуют в виде агломератов, размер которых достигает 10 мкм и более.

Действие композитной системы на суспензию *S. cerevisiae* исследовали в 10%-м растворе сахарозы (микроэлементы не вносили). Кинетические кривые выделения CO_2 суспензией клеток при разных концентрациях композита, содержащего смесь кремнезёмов, дрожжи, воду и *n*-декан, приведены на рис. 3. На начальном этапе брожения активное выделение CO_2 происходит за счет присутствия в растворе достаточного количества питательных веществ. Затем газовыделение замедляется ввиду образования продуктов жизнедеятельности дрожжей (этанол и углекислый газ) и уменьшения количества сахарозы. Вторая и третья волны роста газовыделения (см. рис. 3) обусловлены циклами размножения и гибели дрожжей. Полученные результаты показывают наличие существенного активирующего влияния композитной системы на процессы жизнедеятельности клеток *S. cerevisiae* в диапазоне концентраций твердой фазы (0,2–1,0 г).

Поскольку развитие суспензии клеток дрожжей продолжалось около месяца, то после окончания опыта определяли количество сахарозы, не использованной клетками (согласно молибденовому методу [14]). При этом весовым методом фиксировали прирост биомассы дрожжевых клеток (табл. 1). В результате опыта установлено, что при количестве композита, равном 0,05 и 0,1 г, прирост массы клеток дрожжей составляет 354 и 152% соответ-

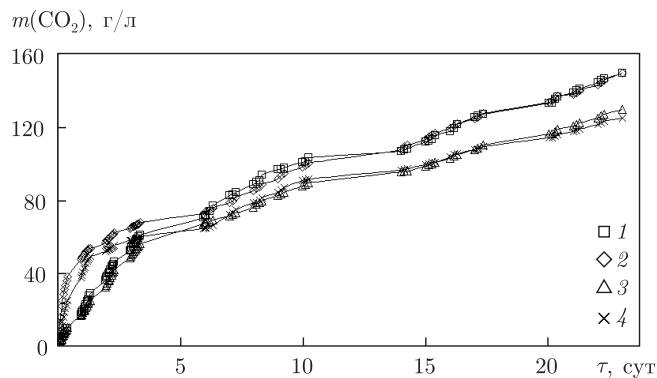


Рис. 3. Кинетические кривые выделения CO_2 суспензией дрожжевых клеток в составе композитной системы массой 0,2 г (1) и 1 г (2) в сравнении с чистой культурой *S. cerevisiae* 0,1 г (3) и 0,5 г (4)

венно. При увеличении массы композита до 0,5 г прирост биомассы уменьшается почти в 2,5 раза, а при $m > 1$ г накопление биомассы практически не наблюдается. Следовательно, малые концентрации смеси нанокремнеземов (до 0,01 г) существенно стимулируют рост биомассы дрожжевых клеток.

Графики зависимости изменения оптической плотности суспензии дрожжей от времени их культивирования в присутствии отработанного масла приведены на рис. 4. Навеска композитной системы составляла 1 г, а количество масла варьировалось в диапазоне от 1 до 10 мл/100 мл H_2O с интервалом 1 мл (образцы 1–10 на рис. 4). Контролем служила водная среда без кремнезема и *n*-декана, содержащая дрожжевые клетки (образец 11), а также *S. cerevisiae* с маслом (образец 12). Установлено наличие трех максимумов на зависимостях прироста биомассы от времени после окончания периода приспособления дрожжей к среде. Первый максимум фиксируется в первые сутки культивирования для образцов 1–4 и 6–12. Он соответствует периоду перестройки клетками ферментативной системы и началу утилизации ими углеводов. Первоначально *S. cerevisiae* питаются легкими фракциями углеводов. Со временем условия изменяются: легкодоступных фракций становится меньше, что замедляет процесс размножения клеток и приводит к уменьшению их количества в водной среде. На вторые сутки культивирования происходит активирование других ферментов, способствующих окислению клетками тяжелых фракций углеводоро-

Таблица 1. Влияние композита на рост *S. cerevisiae*

Масса композита, г	Состав композита, г		Прирост биомассы дрожжей	
	дрожжи	AM1-300 + A-300	г	%
0,05	0,025	0,005	0,092	354
0,10	0,050	0,010	0,078	152
0,20	0,100	0,020	0,038	37
0,50	0,250	0,050	0,006	21
1,00	0,500	0,100	Не изм.	Не изм.
2,00	1,000	0,200	Не изм.	Не изм.
—	0,100*	—	0,051	99
—	0,250*	—	0,068	53
—	0,500*	—	0,056	22
—	1,000*	—	Не изм.	Не изм.

*Контрольные образцы.

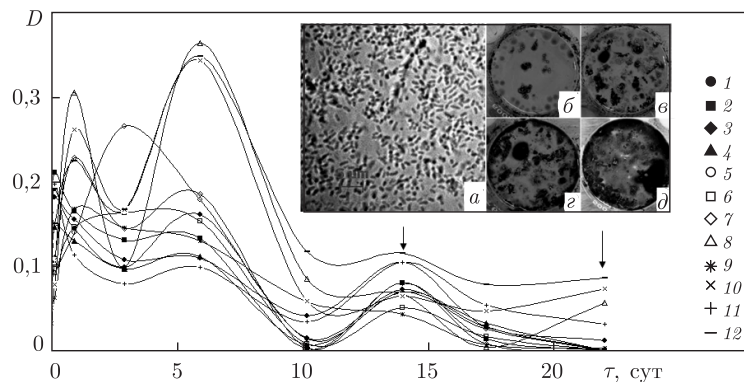


Рис. 4. Зависимость оптической плотности суспензии дрожжей ($D = 540 \text{ нм}$) от времени их культивирования в составе композита при разном содержании масла в водной среде. (Состав образцов 1–12 см. в тексте).

На вставке — микрофотография бактерий, присутствующих в суспензии дрожжевых клеток при деструкции масла (а), и деструкция композитной системы отработанного масла двигателя внутреннего сгорания (через 22 сут) при его исходном количестве: 5 мл (б), 6 мл (в), 7 мл (г), 9 мл (д)

дов, что вызывает появление второго максимума оптической плотности для образцов 5, б, а на пятые сутки — для 1–4 и 7–12. Этот максимум более интенсивный для тех образцов, в которых содержится меньшее количество масла. Интенсивное размножение дрожжей приводит к истощению запасов углеводов, накоплению продуктов жизнедеятельности и отмиранию старых клеток.

В процессе роста дрожжи обогащают среду рядом продуктов своего метаболизма и делают ее более благоприятной для развития бактерий. В присутствии дрожжей бактерии могут развиваться на тех питательных средах, на которых они самостоятельно не развиваются. Это наблюдается на средах, лишенных ряда витаминов, аминокислот и т. д. Бактерии фиксируются в дрожжевом осадке, где они имеют благоприятную среду для своего существования [15]. На 13-е сут исследования деструкции машинного масла наблюдается третий пик прироста биомассы для всех образцов, который отвечает бурному размножению бактерий (см. рис. 4, а). Окисление бактериями углеводов отработанного масла завершает его деструкцию.

Результаты изучения способности дрожжевых клеток, входящих в состав композита, к деструкции углеводов в водной среде, не содержащей углеводов приведены на рис. 4, б–д. В анаэробных условиях процесс дыхания является энергетически более выгодным, чем брожение, что ускоряет деление *S. cerevisiae*. Визуально это проявляется в виде помутнения растворов и постепенной деструкции масляной пленки на поверхности воды (см. рис. 4, б–д). Во всех опытах наблюдается деструкция масляной пленки под влиянием композитной системы, содержащей дрожжевые клетки. Степень деструкции зависит от времени и количества масла.

Таким образом, на основе смеси гидрофобного и гидрофильного кремнезема (АМ1–300 и А-300 соответственно), воды, *n*-декана и дрожжевых клеток создана композитная система, позволяющая проводить деструкцию углеводов в водной среде. Показано, что выбранная смесь кремнезема активирует процессы деления клеток как в водной среде, так и в самом композите. Полная ремедиация загрязненной углеводородами (отработанное масло двигателей внутреннего сгорания) воды осуществляется за 22 сут в случае, когда их количество не превышает 14 мл/л.

Цитированная литература

1. Лодоло А., Гречищева Н. Ю., Мещеряков С. В., Рыбальский Н. Г., Снакин В. В., Барсов А. Р., Кулындышев В. А. Технология восстановления почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. Справочник. – Москва: РЭФИА, НИА-Природа, 2003. – 258 с.
2. Вельков В. В. Биоремедиация: принципы, проблемы, подходы // Биотехнология. – 1995. – № 3–4. – С. 20–27.
3. Логина О. О., Данг Т. Т., Белоусова Е. В., Шалимова С. С., Шевченко М. Ю., Грабович М. Ю. Биодegradация нефтепродуктов в почве штаммами микроорганизмов рода *Acinetobacter* // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: Межрег. сб. науч. работ. – Вып. 12. – Воронеж: Центр.- Чернозем. кн. изд-во, 2010. – С. 129–136.
4. Миронов О. Г., Дорошенко Ю. В. Нефтеокисляющие дрожжи перифитона систем гидробиологической очистки морских вод // Мор. екол. журн. – 2007. – 6, № 2. – С. 58–62.
5. Toren A., Navon-Venezia S., Ron E. Z., Rosenberg E. Emulsifying activities of purified Alasan proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53 // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – 67, No 3. – P. 1102–1106.
6. Чугунов В. А., Ермоленко З. М., Жиглецова С. К., Мартовецкая И. И., Миронова Р. И., Жиркова Н. А., Холоденко В. П. Разработка и испытания биосорбента “Экосорб” на основе ассоциации нефтеокисляющих бактерий для очистки нефтезагрязненных почв // Прикл. биохим. и микробиол. – 2000. – 36, № 6. – С. 661–665.
7. Ellis S., Balba M. T., Theile P. Bioremediation of oil contamination land // Environ. Sci. Technol. – 1990. – 11, No 5. – P. 443–454.
8. Цимберг Е. А., Титова Л. В., Курдиш И. К. Влияние высокодисперсных материалов на рост дрожжей рода *Candida* // Микробиол. журн. – 1991. – 53, № 4. – С. 55–58.
9. Курдиш И. К., Бихунов В. Л., Цимберг Е. А., Ельчиц С. В., Выговская Е. Л., Чуйко А. А. Влияние дисперсного диоксида кремния – аэросила А-300 на рост дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Микробиол. журн. – 1991. – 53, № 2. – С. 41–44.
10. Крупская Т. В., Турова А. А., Гунько В. М., Туров В. В. Влияние высокодисперсных материалов на физиологическую активность дрожжевых клеток // Биополимеры и клетка. – 2009. – 25, № 4. – С. 290–297.
11. Gun'ko V. M., Turov V. V., Bogatyrev V. M., Zarko V. I., Leboda R., Goncharuk E. V., Novza A. A., Turov A. V., Chuiko A. A. Unusual Properties of Water at Hydrophilic/Hydrophobic Interfaces // Adv. Colloid and Interface Sci. – 2005. – 118. – P. 125–172.
12. Гунько В. М., Туров В. В., Горбик П. П. Вода на межфазной границе. – Киев: Наук. думка, 2009. – 694 с.
13. Gun'ko V. M., Turov V. V. Nuclear Magnetic Resonance Studies of Interfacial Phenomena. – New York: Taylor & Francis, 2013. – 1076 p.
14. Починюк Х. Н. Методы биохимического анализа растений. – Киев: Наук. думка, 1976. – 334 с.
15. Квасников Е. И., Щелкова И. Ф. Дрожжи. Биология. Пути использования. – Киев: Наук. думка, 1991. – 328 с.

References

1. Lodolo A., Grechishcheva N. Y., Meshcheryakov S. V., Rybalskyi N. G., Snakin V. V., Barsov A. R., Kulyndyshev V. A. Technology of recovery of soils, polluted of petroleum and oil products. Directory, Moscow: REFIA, NIA-Nature, 2003 (in Russian).
2. Velkov V. V. Biotechnology, 1995, No 3–4: 20–27 (in Russian).
3. Loginova O. O., Dang T. T., Belousova E. V., Shalimova S. S., Shevchenko M. Y., Grabovich M. Y. Organization and regulation of physiological biochemical processes: Interreg. collect. sci. pap., Iss. 12, Voronezh: Centr. Black Earth Publ., 2010 (in Russian).
4. Mironov O. G., Doroshenko Y. V. Mar. ecol. J., 2007, 6, No 2: 58–62 (in Russian).
5. Toren A., Navon-Venezia S., Ron E. Z., Rosenberg E. Appl. Environ. Microbiol., 2001, 67, No 3: 1102–1106.
6. Chugunov V. A., Ermolenko Z. M., Zhygletsova S. K., Martovetskaya I. I., Mironova R. I., Zhirkova N. A., Kholodenko V. P. Appl. biochem. and microbial., 2000, 36, No 6: 661–665 (in Russian).
7. Ellis S., Balba M. T., Theile P. Environ. Sci. Technol., 1990, 11, No 5: P. 443–454.

8. *Tsymberg E. A., Titova L. V., Kurdish I. K.* Microbiol. J., 1991, **53**, No 4: 55–58 (in Russian).
9. *Kurdish I. K., Bihunov V. L., Tsymberg E. A., Elchits S. V., Vygovskaya E. L., Chuiko A. A.* Microbiol. J., 1991, **53**, No 2: 41–44 (in Russian).
10. *Krupskaya T. V., Turova A. A., Gun'ko V. M., Turov V. V.* Biopolymers and cells, 2009, **25**, No 4: 290–297 (in Russian).
11. *Gun'ko V. M., Turov V. V., Bogatyrev V. M., Zarko V. I., Leboda R., Goncharuk E. V., Novza A. A., Turov A. V., Chuiko A. A.* Adv. Colloid Interface Sci., 2005, **118**: 125–172.
12. *Gun'ko V. M., Turov V. V., Gorbik P. P.* Water at the interface, Kiev: Nauk. Dumka, 2009 (in Russian).
13. *Gun'ko V. M., Turov V. V.* Nuclear Magnetic Resonance Studies of Interfacial Phenomena, New York: Taylor & Francis, 2013.
14. *Pochinok Ch. N.* Methods biochemically of analysis plants, Kiev: Nauk. Dumka, 1976 (in Russian).
15. *Kvasnikov E. I., Schelkova I. F.* Yeasts. Biology. Ways use, Kiev: Nauk. Dumka, 1991 (in Russian).

Институт химии поверхности
и.м. А. А. Чуйко НАН Украины, Киев
Macrosorb. LT, Вильнюс, Литва

Поступило в редакцию 23.06.2015

**Т. В. Крупська, І. В. Сіора, Н. Ю. Клименко, О. А. Новікова,
А. П. Головань, Л. А. Суворова, член-кореспондент НАН України В. В. Туров**

Моделювання композитної системи для ремедіації води на основі нанокремнеземів та дріжджових клітин

Інститут хімії поверхні ім. О. О. Чуйка НАН України, Київ
Macrosorb. LT, Вільнюс, Литва

Створено модельну композитну систему на основі суміші гідрофобного (AM1-300) і гідрофільного (A-300) кремнеземів, дріжджових клітин, води і n-декану. Досліджено вплив нанокремнеземів на інтенсивність росту дріжджів роду Saccharomyces cerevisiae. Показано, що наявність композита забезпечує життєдіяльність дріжджових клітин навіть при відсутності поживного середовища. Встановлено, що малі концентрації суміші нанокремнеземів стимулюють ріст біомаси клітин. Отримані результати свідчать про те, що створений нанобіокомпозит є ефективним біодеструктором вуглеводнів у водному середовищі.

Ключові слова: нанокремнезем, міжфазові явища, очищення води, дріжджові клітини, де-струкція вуглеводнів.

**T. V. Krupskaya, I. V. Siora, N. Y. Klymenko, E. A. Novikova, A. P. Golovan,
L. A. Suvorova, Corresponding Member of the NAS of Ukraine V. V. Turov**

Modeling a composite system for remediation of water on the basis of nanosilica and yeast cells

O. O. Chuiko Institute of Surface Chemistry of the NAS of Ukraine, Kiev
Macrosorb. LT, Vilnius, Lithuania

A model system of a composite based on mixes of hydrophobic (AM1-300) and hydrophilic (A-300) silicas, yeast cells, water, and n-decane was created. The influence of nanosilicas on the intensity of growth of yeast genus Saccharomyces cerevisiae was investigated. It was shown that the presence

of the composite provides the vital activity of yeast cells even in the absence of a nutrient medium. It was found that small concentrations of the mixture of nanosilicas can stimulate the growth of cells biomass. Our results indicate that the created nanobiocomposite is an effective biodestructor of hydrocarbons in aqueous medium.

Keywords: nanosilica, interfacial phenomena, water purification, yeast cells, destruction of hydrocarbons.