

Н.С. Щеглова<sup>1</sup>, О.Я. Карпенко<sup>2</sup>, Р.І. Вільданова<sup>1</sup>, К. Грабас<sup>3</sup>, В.П. Новіков<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Відділення фізико-хімії горючих копалин  
Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л. М. Литвиненка  
НАН України

<sup>2</sup>Національний університет “Львівська політехніка”,  
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

<sup>3</sup>Технічний університет (м. Вроцлав, Польща)

## БИОСУРФАКТАНТИ – СТИМУЛЯТОРИ НАФТООКИСНЮВАЛЬНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

*О Щеглова Н.С., Карпенко О.Я., Вільданова Р.І., Грабас К., Новіков В.П., 2008*

**Асоціації природних вуглеводнеокиснювальних мікроорганізмів, що ізольовані із нафтозабруднених об'єктів Західної України, можуть успішно застосовуватись для ремедіації ґрунтів і води. Визначено, що біосурфактанти підвищують ступінь мікробної деструкції нафтових вуглеводнів, що сприяє ефективному очищенню забруднених територій.**

**Associations of natural hydrocarbon-oxidizing microorganisms, isolated from petroleum-polluted objects of Western Ukraine, can be successfully applied for remediation of soil and water. It was determined, that biosurfactants increase the degree of microbial destruction of petroleum hydrocarbons, which promotes the effective remediation of the contaminated territories.**

**Постановка проблеми та її зв'язок з важливими науковими питаннями.** Ґрунти є найважливішим компонентом геоекологічної системи і мають велике соціально-економічне та гігієнічне значення. Одним з важливих показників санітарного стану ґрунтів є вміст в них вуглеводнів нафти, що особливо актуально для територій нафтогазовидобувних, нафтопереробних підприємств, магістральних нафтопроводів та інших промислових об'єктів, які потерпають від періодичних аварійних розливів внаслідок технологічних порушень та хронічних забруднень. Екологічні наслідки роботи підприємств, а також негативний техногенний вплив довготермінового видобування нафти на території західного регіону України спричиняють загрозу як для природних ресурсів, так і для населення. Враховуючи вищезазначене, на сучасному етапі проблема очищення від нафтових вуглеводнів є актуальною для усіх нафтодобувних регіонів, а також країн, що видобувають, транспортують та споживають нафту.

Найефективнішим шляхом розв'язання цього завдання є розроблення і впровадження нових комплексних шляхів відновлення забруднених об'єктів (ґрунти, водні ресурси) для покращення загального екологічного стану довкілля, підвищення безпеки життя та здоров'я всіх категорій населення.

Найперспективнішими сучасними методами очищення та відновлення забруднених територій є біологічні методи із застосуванням природних нафтоокиснювальних мікроорганізмів. Але здійснення біоочищення ускладнюється сорбцією забруднювачів на ґрунтах, їх високими концентраціями, гідрофобними властивостями нафтопродуктів, що ускладнює їх утилізацію мікроорганізмами [1–3]. Для вирішення цієї проблеми можуть успішно застосовуватися як різноманітні високодисперсні матеріали з сорбційними властивостями, так і поверхнево-активні сполуки, пріоритетними серед яких є природні ПАВ – продукти мікробного синтезу [4, 5].

**Мета роботи** – дослідити вплив біосурфактантів і мінералу глауконіту на вуглеводнеокиснювальні мікроорганізми під час їх використання у біоремедіації нафтозабруднених ґрунтів.

### Експериментальна частина. Об'єкти досліджень:

1. Автохтонні асоціації мікроорганізмів виділяли із ґрунтів на забруднених територіях нафтовидобувних підприємств Західної України: Надвірнянського НПЗ “Нафтохімік Прикарпаття”, НГДУ “Долина нафтогаз” (Івано-Франківської обл.).

2. Поверхнево-активний біокомплекс PS штаму *Pseudomonas* sp. PS-17, для отримання якого використовували попередньо розроблену методику [6].

3. Глауконіт (ТУУ02497915.001-2001, НВКП “Екоресурс”, Хмельницька обл., Україна) – глинистий мінерал, належить до групи гідролітів підкласу шаруватих силікатів. До його складу входять іони калію, заліза, магнію, алюмінію, фосфору, кальцію та широкий спектр мікроелементів.

Мікроорганізми-деструктори виділяли методом накопичувальної культури на середовищі Шишкіної-Троценко з нафтою і рідкими парафінами як джерелами вуглецю [7]. Ізольовані мікробні асоціації культивували на середовищі з 1 % нафти на круговій качалці (80 об/хв, 23–25 °С), час культивування – 7 діб.

Вплив біокомплексу PS на твердому середовищі на ріст мікроорганізмів-деструкторів визначали методом агарових блоків [8].

Модельні досліди з очищення нафтозабруднених ґрунтів і піску проводили в поліетиленових ємкостях, з робочою масою ґрунту (піску) 0,5 кг. Забруднення нафтою становило 2 %, тривалість експерименту – 2 місяці.

В експериментах на рідкому середовищі і на ґрунтах застосовували біокомплекс PS у концентрації 0,05 і 0,1 г/л, вміст глауконіту у поживному середовищі росту мікроорганізмів становив 1 г/л.

Вміст залишкових вуглеводнів у водному і ґрунтовому середовищах визначали за методом [9].

**Результати досліджень.** З метою визначення робочих концентрацій біоПАР, що не спричиняють інгібуючого впливу на ґрунтові мікроорганізми і можуть використовуватися для біоочищення ґрунтів і води, вивчався вплив біокомплексу PS на ріст бактеріальних асоціацій на твердих поживних середовищах. Встановлено концентрації біокомплексу PS, що інгібують ріст мікробних асоціацій, результати експерименту наведено в табл. 1.

### Зони інгібування росту асоціацій мікроорганізмів-деструкторів

Асоціація	Концентрація біокомплексу, г/л	Зона затримки росту, мм
RV3	0,10	-
	0,25	12,00 ± 0,01
	0,50	17,25 ± 0,01
	0,75	19,70 ± 0,02
	1,00	23,50 ± 0,01
N	0,10	-
	0,25	12,00 ± 0,01
	0,50	17,90 ± 0,01
	0,75	20,70 ± 0,02
	1,00	23,75 ± 0,01

Отже, показано, що у дослідях з очищення ґрунтів від нафтових забруднень поверхнево-активний біокомплекс PS може використовуватися у концентраціях, які не перевищують 0,25 г/л.

Для визначення оптимальних концентрацій біокомплексу в експериментах на рідкому поживному середовищі було протестовано природні асоціації мікроорганізмів – деструкторів, здатних до ефективної утилізації вуглеводнів нафти. Встановлено, що асоціація N складається з трьох видів бактерій, які за первинною ідентифікацією, належать до родів *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*. Додавання поверхнево-активного біокомплексу PS в концентрації 0,05 г/л до

поживного середовища під час культивування мікроорганізмів стимулювало ступінь деструкції нафтопродуктів на 8–10 %. За збільшення вмісту біокомплексу до 0,1 г/л утилізація нафтових вуглеводнів зросла на 15–17 %. При застосуванні вищих концентрацій цього ПАР не вдалося покращати результати мікробного окиснення забруднювачів.

Показано також стимулювальний вплив біокомплексу PS в концентрації 0,05 г/л на ріст асоціації RV3 на рідкому поживному середовищі з вазеліною олією (1 %). Ступінь деструкції вуглеводнів у присутності біоПАР зростала на 10 % порівняно з контрольним.

Аналіз результатів модельного експерименту з очищення забруднених ґрунтів з використанням асоціацій N, RV3, біоПАР, сорбенту глауконіту показав, що додавання поверхнево-активного компонента біоремедіаційної системи (біокомплексу PS) і глауконіту приводить до підвищення ефективності процесу: вміст залишкових нафтопродуктів становить 28 % у варіанті з біокомплексом і 54 % у варіанті без нього. Мікробіологічний аналіз ґрунтів дав змогу встановити, що після очищення, в пробах з біокомплексом кількість гетеротрофних мікроорганізмів збільшилась у 4 рази у порівняно із контрольним. Отже, додавання біоПАР у поживне середовище стимулює процес розкладу токсичних нафтопродуктів і, відповідно, ріст мікроорганізмів, що свідчить про загальне “оздоровлення” ґрунту.

**Висновки.** Із нафтозабруднених об’єктів Західної України отримані асоціації природних мікроорганізмів-деструкторів вуглеводнів, що рекомендовані для використання у рекультивації ґрунтів і очищення води. БіоПАР – продукти мікробного синтезу – підвищують ступінь біодеградації нафтопродуктів, що сприяє успішній ремедіації забруднених територій.

#### **Дослідження виконані в рамках проекту УНТЦ 3494.**

1. *Vidali M. Bioremediation. An overview. Pure Appl. Chem. – 2001. – Vol. 73, No. 7. – P. 1163–1172.*
2. *Bognolo G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons, Colloid. and surface A: Physical Chemistry and Engineering. – 1999. – 152. – P. 41–52.*
3. *Ron E.Z. and Rosenberg E. Natural roles of biosurfactants, Env. Microbiology. – 2001. – 3(4). – P. 229–236.*
4. *Shulga A., Karpenko E., Vildanova-Martsishin R., Turovsky A., Soltys M. Biosurfactant-enhanced remediation of oil-contaminated environments // Adsorp. Sci. Technol. – 2000. – Vol. 18, № 2. – P. 171–176.*
5. *Desai, I.M. Banat – Microbial production of surfactants and their commercial potential, Microbiol. and Molecul. Biology Reviews. – 1997. – 61, 1. – P. 47–64.*
6. *Shulga, A., Karpenko E., Vildanova R., Elyseev, S., Turovsky A. and Shcheglova N. – 1996. Surface-active compounds of Pseudomonas sp. S-27 strain. Microbiol. J. (Ukraine). 52. – P. 78–82.*
7. *Ilyina A. \*, Castillo Sanchez M.I., Villarreal Sanchez J.A. \*, Ramirez Esquivel G. Isolation of soil bacteria for bioremediation of hydrocarbon contamination // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. – 2003. – Т. 44, № 1. – С. 88–91.*
8. *Сеги Й. Методы почвенной микробиологии. – М.: Колос, 1983. – 296 с.*
9. *Унифицированные методы анализа вод / Под ред. Лурье Ю.Ю. – М.: Химия, 1973. – 324 с.*