

**Р.І. Вільданова-Марцишин, Т.Я. Покинсьброда, О.Я. Карпенко\*, В.П. Новіков\***

Відділення фізико-хімії горючих копалин  
Інституту фізико-органічної хімії і вуглекімії ім. Л. М. Литвиненка  
НАН України

\* Національний університет “Львівська політехніка”,  
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

## **СКРИНІНГ МІКРООРГАНІЗМІВ-ДЕСТРУКТОРІВ ВУГЛЕВОДНІВ ІЗ ЗАБРУДНЕНИХ НАФТОПРОДУКТАМИ ОБ’ЄКТІВ ЗАХІДНОЇ УКРАЇНИ**

© Вільданова-Марцишин Р.І., Покинсьброда Т.Я., Карпенко О.Я., Новіков В.П., 2008

**Виділено та ідентифіковано активні асоціації мікроорганізмів – деструкторів нафтових забруднень. Експериментально встановлено, що отримані асоціації здатні утилізувати до 40–60 % нафти при культивуванні їх на рідкому середовищі Шишкіної–Троценко.**

**The active associations of microorganisms–destructors of oil contaminations are selected. Their composition are determined. It was shown associations utilize from 40 % to 60 % oil at cultivation of them on the liquid environment of Shishkini-Trocenko.**

**Постановка проблеми.** Серед найпоширеніших і найнебезпечніших техногенних забруднювачів довкілля основне місце займають нафтопродукти. Це пояснюється їхньою здатністю утворювати токсичні сполуки у ґрунтах, поверхневих та підземних водах. Проблема очищення від нафтових забруднень є надзвичайно складною і актуальною на підприємствах нафтогазового комплексу, а також в усіх нафтодобувних регіонах. Складність цієї проблеми полягає у такому:

- достатньо великі концентрації забруднювачів природних об’єктів;
- сорбція забруднювачів на ґрунтах, що ускладнює їхнє видалення;
- загроза забруднення підземних вод;

– токсичний, мутагенний, генотоксичний та канцерогенний вплив на довкілля, сільсько-господарські та харчові продукти [1].

Нафтові забруднення важко розкладаються у зв’язку з їхньою складною хімічною природою, високою стійкістю і стабільністю до дії факторів довкілля (температури, сонячної радіації, вологості тощо). Ґрунти, що забруднені нафтою та нафтопродуктами, характеризуються порушеною структурою, при якій ґрунтові частинки втрачають свою нормальну будову. Це порушує газообмін і водне живлення, призводить до запласованості ґрунтових горизонтів і, своєю чергою, викликає різке зниження кількісного та якісного складу ґрунтових мікроорганізмів, рослин, ґрунтової фауни, різко знижує біопродуктивність ґрунтів. Все це інгібує біохімічні процеси і порушує С/Н/Р/К-співвідношення в забруднених ґрунтах, порушує важливі мікробіологічні процеси у ґрунті (азотфіксацію, амоніфікацію, нітрифікацію тощо) та різко знижує ґрунтове дихання впродовж значного часу ( до 10–20 років).

Для очищення ґрунтів, забруднених нафтою, використовуються фізичні (видалення поверхневого забрудненого шару ґрунтів або його барботаж/вентиляція, закачування ґрунтових вод і їхня обробка, введення пари у забруднені ґрунти, підсилення забезпечення киснем) і хімічні (екстракція подвійною фазою) способи, але всі вони трудомісткі та потребують великих витрат і часу для регенерації і відновлення ґрунтів. Наприклад, витрати лише для вилучення і транспортування забрудненого ґрунту, із середнім рівнем забруднення вуглеводнями, об’ємом 5000 кубічних ярдів (9000 тон) з площі 1,3 га становить близько 500 000 \$, тоді як витрати на відновлення і регенерацію забруднених ґрунтів за допомогою рослин без здійснення подібних заходів становлять 17 \$ /тонну ґрунту [2]. Крім того, якщо фізико-хімічні способи очищення забруднених ґрунтів мають одноразовий ефект, то біологічні способи дають триваліший вплив і стабільне покращання екологічної ситуації. Вони можуть бути використані як для одноразового термінового очищення забруднених ґрунтів, так і для профілактики стану земель, що часто піддаються

нафтовим забрудненням [3, 4]. Переваги біологічних методів загальноприйняті з економічного, енергетичного та екологічного погляду. Для усіх методів біоремедіації першою і найголовнішою умовою успішності є наявність високоактивних штамів мікроорганізмів-деструкторів [5, 6, 7]

**Метою роботи** є одержання високоактивних штамів мікроорганізмів-деструкторів нафти та нафтопродуктів і їхнє використання у біоремедіації та фіторемедіації нафтозабруднених ґрунтів.

**Експериментальна частина.** Об'єкти досліджень – природні (автохтонні) асоціації мікроорганізмів, біоПАР, глауконіт, мікросфера.

Об'єкти досліджень – природні (автохтонні) асоціації мікроорганізмів виділяли із нафтозабруднених ґрунтів, що були взяті на територіях нафтовидобувних підприємств Західної України: с. Уличне Стрийського району Львівської області, НГДУ “Долина нафтогаз” (на території земляних амбарів нафтошламів з частково переробленими, застарілими відходами нафтопродуктів, родовище нафти “Уличне”) та Надвірнянського нафтопереробного заводу Івано-Франківської області.

Мікроорганізми-деструктори виділялись методом накопичувальної культури [8]. Для отримання стабільних мікробних препаратів асоціації деструкторів послідовно пересівали на рідке середовище Шишкіної–Троценко [9] з нафтою і рідкими парафінами як єдиними джерелами вуглецю. Для подальшої роботи відбирали асоціації, що добре росли на нафті або рідких парафінах. Критерієм відбору були такі параметри: біомаса, поверхневий натяг супернатантів культуральних рідин. Виділені асоціації культивували на тому самому середовищі з 1 % нафти на круговій качалці (аерація 220 об/хв, t 28 °C). З метою стимуляції росту мікроорганізмів та утилізації нафти середовище Шишкіної–Троценко модифікували біокомплексом PS (0,005 %), глауконітом (0,1 %) і мікросферою (0,1 %).

Для отримання біокомплексу штам *Pseudomonas* sp. PS-17 культивували у колбах Ерленмейера (750 мл) з робочим об'ємом 150 мл на ротаційній качалці (220 об/хв) за температури 30 °C впродовж 5 діб на середовищі [10]. Як джерело вуглецю використовували гліцерин (2 % мас.). Біокомплекс PS отримували підкисленням супернатанту культуральної рідини штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 до рН 3,0. Отриманий осад відділяли центрифугуванням при 8000 об/хв впродовж 20 хв.

Глауконіт – водний алюмосилікат заліза і магнію, є продукцією НВКП “Екоресурс” . До складу входить велика кількість мікроелементів.

Мікросфера – відходи від спалювання вугілля з Бурштинської ТЕЦ.

Залишкові вуглеводні визначали за методом [11].

Залишкову кількість амонійного азоту у середовищі визначали за методом Неслера [12].

**Результати досліджень.** Однією із важливих умов біоремедіації нафтозабруднених ґрунтів є отримання активних асоціацій мікроорганізмів. Особлива увага у сучасних технологіях очищення ґрунтів і води приділяється застосуванню у цих процесах автохтонних мікроорганізмів. Із зразків забруднених ґрунтів нафтовидобувних підприємств Західної України методом накопичувальних культур було виділено 19 асоціацій мікроорганізмів, які склалися з 2–3 штамів. Виділені асоціації перевірялися на здатність інтенсивно утилізувати нафту на рідких середовищах за короткий термін культивування. В результаті експериментів були відібрані для роботи шість асоціацій, які показали стійкість до пересівів на середовищах з нафтою і рідкими парафінами. Кожна з цих асоціацій складається з двох культур.

Досліджено здатність утилізувати нафту двома асоціаціями – RV1 і RV3 на колбах на середовищі Шишкіної–Троценко впродовж 7 діб при 30°C. Аналізували поверхневий натяг супернатантів культуральних рідин, залишкові кількості вуглеводнів нафти, кількість азоту в супернатанті. Варіанти досліду були такі: 1) контроль (асоціації культивували на середовищі без домішок); 2) додавали глауконіт; 3) біокомплекс PS; 4) глауконіт разом з біокомплексом PS; 5) мікросфера; 6) мікросфера разом з біокомплексом PS. Дані експериментів подано у табл.1 і 2.

Отже, встановлено, що через сім діб культивування асоціація RV1 активно утилізує вуглеводні нафти – 47–60 % від початкової кількості, зменшується кількість азоту в середовищі майже в два рази. Найменша кількість залишкових вуглеводнів спостерігалася у варіанті, де в середовище додавали глауконіт, який є сорбентом і одночасно збагачує середовище різними

мікроелементами. Додавання глауконіту разом з біокомплексом PS в середовище Шишкіної–Троценко також стимулювало утилізацію нафтопродуктів.

Таблиця 1

**Ріст асоціації RV1 на середовищі Шишкіної–Троценко з нафтою (1 %)**

Варіант	Поверхневий натяг, мН/м	Залишкові вуглеводні, %	кількість залишкового амонійного азоту, %
1	49,16	63	47
2	50,81	40	45
3	39,24	56	45
4	35,94	44	29
5	45,85	52	48
6	35,94	56	45

Таблиця 2

**Ріст асоціації RV3 на середовищі Шишкіної–Троценко з нафтою (1 %)**

Варіант	Поверхневий натяг, мН/м	Залишкові вуглеводні, %	кількість залишкового амонійного азоту, %
1	50,81	64	79
2	54,82	70	88
3	54,35	64	73
4	56,71	60	67
5	54,82	54	67
6	50,81	52	67

Також встановлено, що через сім діб культивування асоціації RV3 найменша кількість вуглеводнів зафіксована при додаванні у середовище мікросфери та мікросфери разом з біокомплексом PS. У цих самих варіантах зменшується і кількість амонійного азоту, який вказує на активність асоціації.

**Висновки:**

виділено дві автохтонні асоціації мікроорганізмів з нафтозабруднених ґрунтів, які активно утилізують нафту;

встановлено стимулюючий вплив сорбентів – глауконіту та мікросфери в поєднанні з біокомплексом на деструкцію нафти мікроорганізмами

*Дослідження виконані за проектом УНТЦ 3494.*

1. Wagner F. *Strategies for biosurfactant production.* – *Fat. Sci. Technol.*, 1987, P.586–591.
2. Cunningham, S. D., Anderson, T. A., Schwab, A. P., and Hsu, F.C. 1996. *Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. Advances in Agronomy*, v. 56, pp. 56–114.
3. Rosenberg E., Perry A., Gibson D.T. *Emulsifier of Arthrobacter calcoaceticus RAG-1: specificity of hydrocarbon substrate.* – *Appl. Environ. Microbiol.*, 1979, V.37, N 3, P.409–413.
4. Parkinson M. *Biosurfactants.* – *Biotech. Adv.*, 1985, V.3, P.65–83.
5. Vidali M. *Bioremediation. An overview. Pure Appl. Chem.*, Vol. 73, No. 7, pp. 1163–1172, 2001.
6. Shulga A., Karpenko E., Vildanova-Martysishin R., Turovsky A., Soltys M. *Biosurfactant-enhanced remediation of oil-contaminated environments.* – *Adsorp. Sci. Technol.*, 2000, V.18. – № 2. – P.171–176.
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. Kolwzan B. *Bioremediacja gleb skazonych produktami naftowymi wraz z ocena ekotoksykologiczna – OWPW, Wroclaw, 2005, 212.*
10. Єрохін В.А., Покинсьброда Т.Я., Карпенко О.В., Новіков В.П. *Дослідження росту та синтезу цільового продукту штамом Pseudomonas species PS-17 – продуцентом позаклітинних біосурфактантів // Вісник НУ “Львівська політехніка”, Хімія та технологія хімічних речовин, 2006.*
11. Унифицированные методы анализа вод / Под ред. Ю.Ю. Лурье. – М.: Химия, 1973. – 324 с.
12. PKN. *Badania zawartosci zwiazkow azotu. PN-C-04576-4, 1994.*