

А.П. Морозова, магістрант
А.І. Сорокіна, магістрант
Т.П. Пирог, д-р біол. наук
С.І. Аятов'юк

РОЛЬ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* ЕК-1 ТА *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* К-4 У ПРОЦЕСАХ ОЧИЩЕННЯ ҐРУНТУ ВІД НАФТОВИХ ЗАБРУДНЕНЬ

Встановлено, що поверхнево-активні речовини (ПАР) Rhodococcus erythropolis ЕК-1 та Acinetobacter calcoaceticus К-4 інтенсифікують процеси деструкції нафти у ґрунті.

Через 30 діб ступінь деградації нафти (21,4 г/кг ґрунту) за присутності препаратів ПАР (100—300 мл/кг ґрунту) у вигляді постферментаційної культуральної рідини становив 80—88 %.

Ключові слова: Rhodococcus erythropolis, Acinetobacter calcoaceticus, поверхнево-активні речовини, деструкція нафти, очищення ґрунту.

Прогресуючі темпи нафтового забруднення навколишнього середовища потребують розробки екологічно безпечних та економічно обґрунтованих способів очищення, спрямованих на інтенсифікацію процесів розкладання вуглеводнів. Таким методом очистки ґрун-

© А.П. Морозова, А.І. Сорокіна, Т.П. Пирог, С.І. Аятов'юк, 2009

It was established that surface active substances (SAS) of Acinetobacter calcoaceticus K-4 and Rhodococcus erythropolis EK-1 intensify the oil destruction in soil. After 30 days the efficiency of oil degradation (21,4 g/kg of soil) in the presence of SAS preparations (100—300 ml/kg of soil) in the form of postfermentation of cultural liquids was shown to be 80—88 %.

Key words: Rhodococcus erythropolis, Acinetobacter calcoaceticus K-4, surface active substances, oil destruction, cleaning of soil.

тів і води від нафти є біоремедіація, що базується на природному потенціалі мікроорганізмів. Під біологічним очищенням розуміють два принципово різні шляхи прискорення біодеструкції вуглеводнів у природному середовищі: стимуляція нафтоокиснювальної мікро-

флори створенням оптимальних умов для її розвитку (за присутності поверхнево-активних речовин — ПАР) та введення у забруднену екосистему активних вуглеводеньокиснювальних мікроорганізмів [1—4].

Літературні дані свідчать, що найперспективнішим методом очистки довкілля від нафти і продуктів її переробки є використання нафтоокиснювальних бактерій — продуцентів поверхнево-активних речовин. У цьому разі ефективність деструкції нафтових забруднень зумовлена як діяльністю самих нафтоокиснювальних бактерій (за рахунок високої гідрофобності поверхні), так і участю їхніх метаболітів з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями в активації природної мікрофлори і солюбілізації вуглеводнів [4].

У попередніх дослідженнях [5, 6] нами було показано, що ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 і *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 інтенсифікують процеси деструкції нафти в воді у результаті стимуляції природної нафтоокиснювальної мікрофлори. Показано можливість використання для ефективного (деградація на 81—95 % нафти у концентрації 2,6 г/л) очищення води невисоких концентрацій препаратів ПАР у вигляді культуральної рідини (5 %).

Мета даної роботи — дослідити можливість інтенсифікації процесів очищення ґрунту від нафти за присутності препаратів ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* K-4 та *R. erythropolis* ЕК-1.

Як об'єкти досліджень використовували ізольовані з забрудненого нафтою зразків ґрунту бактеріальні штами *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 та *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, депоновані в Депозитарії Інституту мікробіології та вірусології під номерами ІМВ Ас-5017 та ІМВ В-7241, відповідно.

Культивування *R. erythropolis* ЕК-1 проводили на мінеральному поживному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 — 1,3; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; NaCl — 0,1; Na_2HPO_4 — 0,6; KH_2PO_4 — 0,14; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; рН 6,8—7,0. Як джерело вуглецю використовували гексадекан у концентрації 2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту (48 год), вирощену на середовищі наведеного складу з 1 % гексадекану. Посівний матеріал вносили у концентрації 5 % від загального об'єму. Культивування *R. erythropolis* ЕК-1 здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °С упродовж 168 год. Супернатант отримували виморожуванням залишків гексадекану з культуральної рідини з наступним фільтруванням через складчастий фільтр, на якому залишалися шматочки гексадекану з біомасою гідрофобних клітин.

Культивування *A. calcoaceticus* K-4 здійснювали на мінеральному поживному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ — 0,35; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; NaCl — 1,0; Na_2HPO_4 — 0,6; KH_2PO_4 — 0,14; рН 6,8 — 7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів — 0,1 % (об'ємна частка). Як джерело вуглецю і енергії використовували етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовували культуру з кінця експоненційної фази росту (72 год), вирощену на середовищі наведеного складу з 2 % етанолу. Кількість інокуляту — 10 % від об'єму середовища. Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °С

упродовж 120 год. Для одержання супернатанту і туральну рідину центрифугували 30 хв (5000 г).

Кількість синтезованих ПАР визначали за зником умовної концентрації (ПАР*), який визначали як ступінь розбавлення вільної від клітин культуральної рідини у точці збільшення поверхневого натягу на графіку залежності σ від значення розведення. Авіса точки перетину кривої відповідає значенню ПАР. Умовна концентрація ПАР виражається у безрозмірних одиницях.

Для моделювання забрудненого нафтою ґрунту у пластикові ємності вносили по 1 кг ґрунту, добавляючи 20 мл нафти і ретельно перемішували. Як препарат ПАР використовували постферментаційну культуру рідини та супернатант культуральної рідини (1 300 мл на 1 кг ґрунту), в які добавляли по 0,01 % монійфосфату. Ґрунт кожні три дні перемішували покращення аерації та зволожували. Для зволоження використовували стерильну воду. Контролем слугував забруднений ґрунт без препаратів ПАР. В одному з варіантів дослідження використовували стерильний ґрунт пісок. Тривалість дослідження становила 30 діб.

Вміст нафти у досліджуваних зразках визначали ваговим методом. Для цього здійснювали трикратну екстракцію нафти гексаном (співвідношення органічний екстракт випарювали до постійної маси роторному випарникові ІР — 1М2 (Росія) при температурі 55 °С та за абсолютного тиску 0,4 атм).

У табл. 1 наведено дані про умовну концентрацію ПАР у препаратах поверхнево-активних речовин використовуваних для очищення ґрунту від нафти. Препарати *A. calcoaceticus* K-4 характеризувалися практично однаковим показником умовної концентрації ПАР, що становив 3,9—4,0 (табл. 1). У разі препарату *R. erythropolis* ЕК-1 після відділення клітин з культуральної рідини ПАР* знижувався на 20 %. Одержані результати свідчать про те, що за умов росту на етапі *A. calcoaceticus* K-4 синтезує в основному позаклітинні поверхнево-активні речовини, у той час як під час культивування *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі з гексадеканом утворюються як вільні, так і асоційовані клітинами ПАР.

Таблиця
Характеристика препаратів ПАР
A. calcoaceticus K-4 та *R. erythropolis* ЕК-1

Продуцент ПАР	Препарат ПАР	ПАР*
<i>R. erythropolis</i> ЕК-1	Культуральна рідина	4,6
	Супернатант	3,2
<i>A. calcoaceticus</i> K-4	Культуральна рідина	4,6
	Супернатант	3,9

Наступні експерименти показали, що на 30-й день ступінь деградації нафти становив 80—88 % у разі обробки ґрунту препаратами ПАР у вигляді нативної культуральної рідини в концентрації 300 мл/кг ґрунту (табл. 2). Зазначити, що концентрація препаратів ПАР *A. calcoaceticus* K-4 суттєво не впливала на ефективність процесу очищення ґрунту від нафтових забруднень, у той час як для препаратів *R. erythropolis* ЕК-1 ступінь деструкції нафти збільшувався від 65 до 88 % за підвищення концентрації препаратів ПАР у вигляді культуральної рідини від 100 до 300 мл/кг ґрунту (табл. 2).

За використання як препаратів ПАР супернатантів культуральної рідини ефективність деструкції

нафти була значно нижчою (41—59 %). У цьому разі ступінь деструкції нафти практично не залежав від концентрації супернатанту *A. calcoaceticus* K-4 і становив 41—46 %, проте підвищувався з 43 до 59 % для аналогічних препаратів ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 у концентрації 100 і 300 мл/кг ґрунту відповідно. Деякі відмінності в ефективності використання препаратів ПАР штамів *A. calcoaceticus* K-4 і *R. erythropolis* ЕК-1 для очищення ґрунту від нафти можна пояснити різною хімічною природою синтезованих ними метаболітів з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями.

Таблиця 2

Вплив препаратів ПАР
A. calcoaceticus K-4 і *R. erythropolis* ЕК-1
на ефективність очищення ґрунту від нафти

Продуцент ПАР	Препарати ПАР	Концентрація препаратів ПАР, мл/кг ґрунту	Концентрація залишкової нафти в пробі, г	Ступінь деструкції нафти, %
<i>A. calcoaceticus</i> K-4	Культуральна рідина	100	4,1 ± 0,011	80,8 ± 2,1
		200	3,9 ± 0,023	81,8 ± 2,3
		300	3,8 ± 0,003	82,2 ± 2,6
	Супернатант	100	12,2 ± 0,013	43,0 ± 2,2
		200	12,1 ± 0,021	43,5 ± 2,5
		300	12,0 ± 0,033	43,9 ± 2,4
<i>R. erythropolis</i> ЕК-1	Культуральна рідина	100	7,0 ± 0,012	67,3 ± 2,3
		200	5,7 ± 0,028	73,4 ± 2,7
		300	2,9 ± 0,019	86,4 ± 2,0
	Супернатант	100	11,6 ± 0,026	45,8 ± 2,1
		200	10,4 ± 0,015	51,4 ± 2,2
		300	9,3 ± 0,021	56,5 ± 2,7
Контроль		0	21,4 ± 0,015	0

Дані, наведені у табл. 2, можуть свідчити про те, що мікробна деструкція нафти зумовлена як безпосередньою участю у цьому процесі живих клітин нафтоокиснювальних бактерій *A. calcoaceticus* K-4 і *R. erythropolis* ЕК-1 та їхніх метаболітів, так і активацією природної нафтоокиснювальної мікрофлори ґрунту під впливом поверхнево-активних речовин.

У наступних експериментах досліджували вплив препаратів ПАР *A. calcoaceticus* K-4 і *R. erythropolis* ЕК-1 на ступінь очищення від нафти стерильного ґрунту і піску (табл. 3). Такі дослідження проводили з метою виключення впливу на процеси деградації нафти природної нативної мікрофлори.

Таблиця 3

Ефективність очищення стерильного піску
за присутності препаратів ПАР
A. calcoaceticus K-4 і *R. erythropolis* ЕК-1

Продуцент ПАР	Препарати ПАР	Концентрація залишкової нафти в пробі, г	Ступінь деструкції нафти, %
<i>A. calcoaceticus</i> K-4	Культуральна рідина	14 ± 0,013	30 ± 2,5
	Супернатант	16 ± 0,011	20 ± 2,2
<i>R. erythropolis</i> ЕК-1	Культуральна рідина	15 ± 0,015	25 ± 2,3
	Супернатант	17 ± 0,012	15 ± 2,4
Контроль		20 ± 0,017	0

Примітка. Концентрація препаратів ПАР становила 300 мл/кг піску.

Дані, наведені у табл. 3, свідчать, що ступінь очищення забрудненого нафтою (20 г/кг) стерильного піску за присутності препаратів ПАР у вигляді постферментаційної культуральної рідини становив 23—27 % для *R. erythropolis* ЕК-1 і 28—33 % для *A. calcoaceticus* K-4 на 30 добу експерименту. У разі використання препаратів ПАР у вигляді супернатанту ефективність очищення стерильного піску знижувалася приблизно на 10 % для ПАР обох досліджуваних штамів і не перевищувала 13—22 % (табл. 3). Очевидно, деструкція нафти за присутності препаратів ПАР у вигляді супернатанту відбувалася в результаті активації мікрофлори нафти або повітря, оскільки вплив нативної мікрофлори піску та води, використовуваної для його зволоження, було виключено. Вища ступінь деградації нафти за присутності ПАР у вигляді нативної культуральної рідини пояснюється наявністю у таких препаратах вуглеводеньокиснювальних бактерій *R. erythropolis* ЕК-1 та *A. calcoaceticus* K-4.

Наведені дані підтверджують суттєву участь у деструкції нафти природної нафтоокиснювальної мікрофлори і значну роль поверхнево-активних речовин у процесах її активації.

Аналіз літературних даних [1—4] показує, що процеси біодеструкції нафти у ґрунті є довготривалими і становлять від трьох до дев'яти місяців залежно від концентрації нафти і способу очищення. Причому максимальна швидкість зниження вмісту нафти спостерігається упродовж першого місяця (за деякими даними вона становить 0,58 % за добу від загальної кількості нафти). Це можна пояснити тим, що у ґрунті біодоступними є в основному розчинні у водній фазі, а також слабо зв'язані з твердою фазою ґрунту речовини. Ці речовини можуть доволі швидко дифундувати, піддаватися десорбції та переходити у ґрунтовий екстракт. Концентрація біодоступних речовин не є сталою і може змінюватися з часом під дією різних біотичних та абіотичних процесів.

Результати наших досліджень показують, що у разі використання препаратів ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 і *A. calcoaceticus* K-4 можна досягти високої (до 88 %) ефективності очищення ґрунту від нафти уже під кінець першого місяця після забруднення. Можна сподіватися, що ступінь деградації нафти буде вищим (або терміни деструкції нижчими) за використання препаратів з більшою концентрацією поверхнево-активних речовин. Так, у даній роботі використовували препарати з умовною концентрацією ПАР 3—4, у той час як за певних умов культивування продуцентів цей показник може підвищуватися до 6—8 [7].

Висновки. У результаті проведеної роботи встановлено, що поверхнево-активні речовини, синтезовані *R. erythropolis* ЕК-1 і *A. calcoaceticus* K-4, інтенсифікують процеси деструкції нафти у ґрунті завдяки діяльності самих нафтоокиснювальних бактерій-продуцентів ПАР, і участі метаболітів з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями в активації природної мікрофлори і солюбілізації вуглеводнів. Показана можливість використання для ефективного (деградація на 80—88 % нафти у концентрації 21,4 г/кг) очищення ґрунту невисоких концентрацій (100—300 мл/кг ґрунту) препаратів ПАР у вигляді культуральної рідини.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Brakstad O.G., Bonaunet K., Nordtug T., Johansen O.* Biotransformation and dissolution of petroleum hydrocarbons in natural flowing seawater at low temperature // *Biodegradation*, 2004. — Vol. 15. — P. 337—346.

2. *Cubitto M.A., Moran A.C., Commendatore M., Chiarello M.N., Baldini M.D., Sineriz F.* Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils // *Biodegradation*, 2004. — Vol. 15. — P. 281—287.

3. *Meintanis C., Chalkou K.J., Kormas K.A., Karagouni A.D.* Biodegradation of crude oil by thermophilic bacteria isolated from a volcano island // *Biodegradation*, 2006. — N 6. — P. 43—48.

4. *Ron E.Z., Rosenberg E.* Biosurfactants and oil bioremediation // *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002. — Vol. 13, № 3. — P. 249—252.

5. *Антонюк С.И., Пирог Т.П., Сорокина А.И.* Синтез и перспективы практического использования поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 // Сб. трудов Межд. научн. конф. “Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии” (Минск, 3—6 июня 2008). — С. 251—253

6. *Морозова А.П.* Дослідження здатності поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 до активації деструкції нафти у воді // *Харчова промисловість*, 2008. — № 7. — С. 36—39.

7. *Игнатенко С.В., Пирог Т.П.* Влияние внешних факторов на образование поверхностно-активных веществ при периодическом культивировании *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 // Сб. трудов Межд. научн. конф. “Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии” (Минск, 3—6 июня 2008). — С. 164—166.

Надійшла до редколегії 02.02.09 р.