

Т.П. ПИРОГ, доктор біологічних наук
С.І. АНТОНЮК
А.І. СОРОКІНА, студентка
Національний університет харчових технологій

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* K-4 ДЛЯ ДЕГРАДАЦІЇ НАФТОВИХ ЗАБРУДНЕНЬ

Показана можливість використання препаратів поверхнево-активних речовин (ПАР), синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, для очищення води від нафти. Через 30 діб ступінь деградації нафти (2,6 г/л) за присутності 5–30 % (об'ємна частка) препаратів ПАР у вигляді постферментаційної культуральної рідини або її супернатанту становила 81–95 %. Інтенсифікація деструкції нафти зумовлена активацією природної нафтоокиснювальної мікрофлори під впливом поверхнево-активних речовин.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, деструкція нафти, очищення води, активація нафтоокиснювальної мікрофлори

Показана возможность использования препаратов поверхностно-активных веществ (ПАВ), синтезированных *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, для очистки воды от нефти. Через 30 сут степень деградации нефти (2,6 г/л) в присутствии 5–30 % (по объему) препаратов ПАВ в виде постферментационной культуральной жидкости или ее супернатанта составляла 81–95 %. Интенсификация процесса деструкции нефти обусловлена активацией природной нефтеокисляющей микрофлоры под влиянием поверхностно-активных веществ.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, деструкция нефти, очистка воды, активация нефтеокисляющей микрофлоры

Ще відносно недавно ні в кого не виникало сумніву у тому, що навколишнє середовище — повітря, земля і вода — завжди будуть ефективно «переробляти» побутові, промислові і сільськогосподарські відходи. Тепер ми знаємо, що це не так. Людство зіштовхнулось з двома фундаментальними проблемами: переробка відходів, постійно утворюваних у величезній кількості, та деструкція токсичних сполук, що десятиліттями накопичувалися на звалищах, у воді та ґрунті. Безнаказанні викиди у навколишнє середовище промислових відходів за останні 50–100 років призвели до того, що давно працюючі промислові об'єкти, неконтрольовані відвали, бензоколонки і ділянки хімічного забруднення, що виникають в результаті тих чи інших аварій, є небезпечними джерелами забруднення ґрунтових вод і потребують відповідної обробки у найближчому майбутньому. Понад 50 % забруднень навколишнього середовища пов'язано з нафтою і продуктами її переробки.

Одним з можливих шляхів очищення ґрунтів і води від нафтопродуктів є активація природної мікрофлори забруднених об'єктів. Особливо доцільний такий спосіб для застарілих забруднень. Природні механізми самоочищення сприяють розвитку специфічної нафтоокиснювальної мікрофлори на

забруднених ділянках. Велике значення має економічний аспект таких технологій, оскільки використання природної мікрофлори суттєво знижує вартість процесів очищення, не потребує багатотонажного виробництва біопрепаратів і технічних витрат на обробку. Проте за високих концентрацій нафти і нафтопродуктів у ґрунті і воді природні процеси біоутилізації здійснюються дуже повільно.

Потужним регулятором активності мікробної популяції, у тому числі й природної, здатної до окиснення гідрофобних сполук, є поверхнево-активні речовини (ПАР), зокрема ПАР мікробного походження [1]. Емульгування (солюбілізація) вуглеводнів за допомогою ПАР сприяють транспорту гідрофобних речовин з ґрунту і води у мікробні клітини і, таким чином, підвищують їх деградацію. У багатьох працях повідомляється про здатність мікробних ПАР інтенсифікувати деградацію нафтопродуктів як у лабораторних, так і польових умовах [1–4].

У попередніх дослідженнях із забрудненого нафтою ґрунту нами було ізольовано штам бактерій, ідентифікований як *Acinetobacter calcoaceticus* K-4. Встановлено умови культивування *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 на етанолі, що забезпечують підвищення у три рази показників синтезу поверхнево-активних речовин [5].

Мета даної роботи — дослідити можливість інтенсифікації процесу очищення води від нафти за присутності препаратів ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* К-4.

Як препарати ПАР використовували постферментаційну культуральну рідину, одержану після культивування *A. calcoaceticus* К-4 на етанолі, а також супернатант культуральної рідини.

Штам *A. calcoaceticus* К-4 вирощували на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ — 0,3; NaCl — 1,0; Na_2HPO_4 — 0,6; KH_2PO_4 — 0,14; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1, рН 6,8–7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів — 0,1 % (об'ємна частка [5]). 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 культуральну рідину центрифугували упродовж 30 хв (5000 g), надосадову рідину зливали і витримували на киплячій водяній бані 30 хв. Таку термообробку здійснювали для знищення клітин продуцента.

Дослідження процесу очищення води від нафти за участю ПАР *A. calcoaceticus* К-4 проводили на модельній водоймі, якою слугувала ємність з 2 л бюветної води. На поверхню води наносили 2,6 г/л

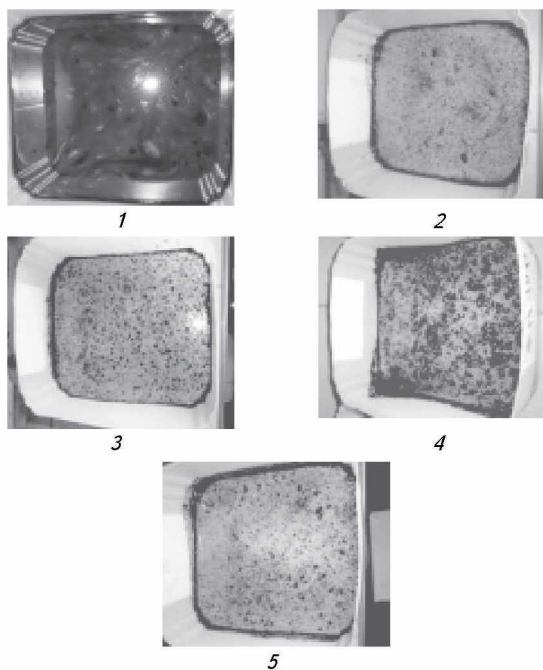


Рис. 1. Ефективність деградації нафти через 7 діб за присутності поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* К-4:

(1) — контроль; (2) і (3) — 5 % і 15 % культуральної рідини; (4) і (5) — 15 і 5 % супернатанта відповідно.

нафти, а потім — препарати ПАР у концентрації 5 і 15 % від об'єму води. Як джерело біогенних елементів, необхідних для життєдіяльності нафтоокиснювальних бактерій, використовували діамонійфосфат у концентрації 0,01 % від об'єму води. В одному з варіантів через тиждень здійснювали повторну обробку води препаратами ПАР у концентрації 5 і 15 %.

Загальну кількість живих клітин (КУО/мл) визначали за методом Коха на середовищі МПА у бюветній воді (до забруднення нафтою), а також у всіх зразках після закінчення експерименту (30 діб).

Вміст нафти у воді визначали ваговим методом після трикратної екстракції гексаном (співвідношення 1:1). Органічний екстракт випарювали до постійної маси на роторному випарнику при 55 °С.

Експерименти показали, що за присутності усіх досліджуваних препаратів поверхнево-активних речовин активна деструкція нафти спостерігалась уже через сім діб (рис. 1). У цей період здійснили повторну обробку деяких модельних водойм препаратами ПАР.

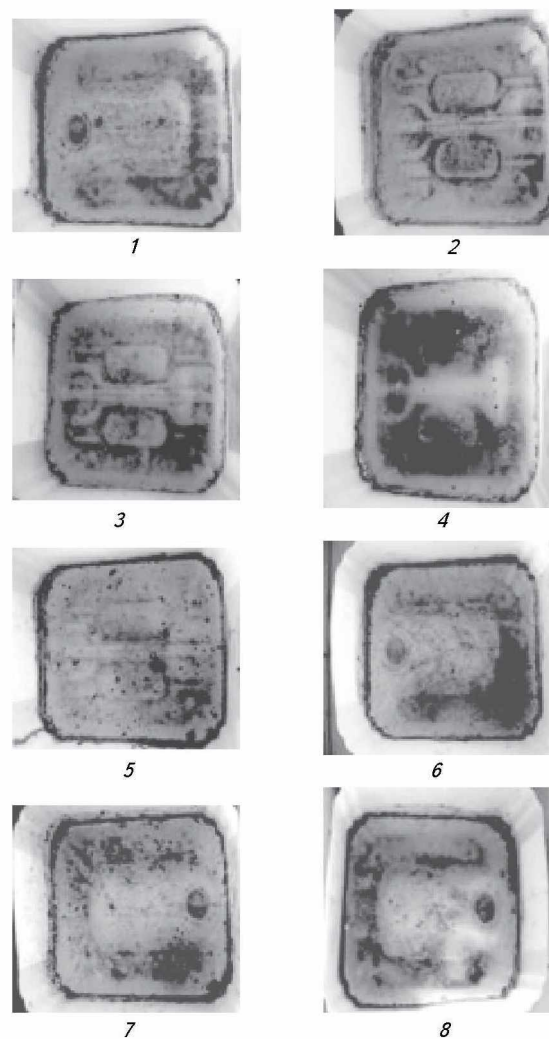


Рис. 2. Ступінь деструкції нафти за присутності препаратів ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 через 20 діб.

Кінцева концентрація препаратів ПАР (%): у вигляді культуральної рідини: (1) — 5; (2) — 10; (3) — 15; (4) — 30; у вигляді супернатанту: (5) — 5; (6) — 10; (7) — 15; (8) — 30.

Надалі у всіх варіантах спостерігали швидку деградацію нафти: нафтова плівка втратила маслянистість, перетворилася на скупчення невеликих сухих пластівців, частина яких перебувала на поверхні води, а частина після перемішування осідала на дно модельного водоймища (рис. 2).

Як видно з даних, наведених на рис. 1 і 2, біодеструкція нафти відбувалась майже однаково у всіх зразках, незалежно від того, у якому вигляді використовували ПАР (культуральна рідина чи супернатант). Слід зазначити, що ми прогнозували вищу ефективність очищення води від нафти у разі застосування культуральної рідини.

Упродовж наступних 10 діб експерименту (з 20 по 30 добу) видимих змін на поверхні модельних водойм не спостерігали. Дані щодо кількісного визначення залишкової нафти на 30 добу експерименту наведено у табл. 1.

Через три тижні ступінь деградації нафти становила 81–95 % (табл. 1). Слід зазначити, що ефективність розкладання нафти практично не залежала від концентрації препаратів ПАР і була достатньо високою (понад 83–85 %) навіть за одноразової обробки ними води. Не виявлено суттєвої різниці у здатності інтенсифікувати процеси деструкції нафти між препаратами у вигляді культуральної рідини і супернатанту.

Одержані результати можуть свідчити про те, що основним механізмом, який зумовлює активну деструкцію нафти за присутності ПАР *A. calcoaceticus* K-4, є активація ними природної нафтоокиснювальної мікрофлори води та нафти. Для перевірки цього припущення аналізували кількісні зміни у складі мікрофлори води упродовж експерименту.

Таблиця 1

Показники очищення води від нафти препаратами поверхнево-активних речовин, синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* K-4

Препарат ПАР	Концентрація препарату ПАР, %	Кількість процедур обробки	Концентрація залишкової нафти, г/л	Ступінь деструкції нафти, %
Культуральна рідина	5	Одна	0,20±0,01	92,3±2,6
	10	Дві	0,32±0,015	87,7±2,3
	15	Одна	0,36±0,018	88,2±2,3
	30	Дві	0,28±0,014	89,2±2,4
Супернатант культуральної рідини	5	Одна	0,44±0,022	83,1±2,1
	10	Дві	0,32±0,015	85,7±2,3
	15	Одна	0,38±0,019	85,4±2,2
	30	Дві	0,32±0,015	87,7±2,2
Без обробки (контроль)			2,6	0

Встановлено, що у воді (до забруднення її нафтою і обробки препаратами ПАР) містилося близько $3,6 \times 10^4$ КУО/мл (табл. 2). Мікрофлора такої води була представлена чотирма морфотипами колоній: №1 — яскраво жовтого (оранжевого) кольору, круглі, опуклі, слизіві, блискучі, з рівними краями, діаметр 2 мм; №2 — жовтуватого кольору, круглі,

опуклі, слизіві, блискучі, з рівними краями, діаметр 3 мм; №3 — округлі, прозоро-білі, опуклі з рівними краями, діаметр 1–2 мм; №4 — світло-жовтого кольору, в центрі яскравіше забарвлення, опуклі, слизіві, прозорі, з рівними краями, діаметр 3–4 мм. Через 30 діб у воді було виявлено три морфотипи (№2–4). Загальна кількість такої мікрофлори води за цей час збільшилась на один-два порядки у різних дослідних варіантах.

Таблиця 2

Кількісна зміна мікрофлори забруднених нафтою модельних водойм через 30 діб після обробки препаратами ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* K-4

Препарат ПАР	Кінцева концентрація препарату ПАР, %	Мікрофлора води, КУО/мл	Стороння мікрофлора, КУО/мл	Загальна кількість клітин, КУО/мл
Культуральна рідина	5	$6,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$7,3 \times 10^6$
	10	$1,1 \times 10^6$	5×10^5	$1,6 \times 10^6$
	15	$1,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$
	30	$5,0 \times 10^5$	$3,3 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$
Супернатант культуральної рідини	5	$6,0 \times 10^5$	4×10^5	$1,0 \times 10^6$
	10	$1,1 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$
	15	$3,0 \times 10^5$	6×10^5	$9,0 \times 10^5$
	30	$4,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$
Вода до обробки (контроль)		$3,6 \times 10^4$	–	$3,6 \times 10^4$

Кількість виявленої через місяць сторонньої мікрофлори у воді (найімовірніше, це мікрофлора нафти і, можливо, повітря) становила від 9×10^5 до 7×10^6 клітин/мл. Така мікрофлора була представлена п'ятьма морфотипами колоній. Цікаво зазначити, що на 30 добу у жодному варіанті із застосуванням препаратів ПАР у вигляді культуральної рідини нам не вдалося виявити клітини *A. calcoaceticus* K-4.

Ці результати свідчать, що одним із механізмів, що зумовлюють інтенсифікацію деградації нафти за присутності ПАР *A. calcoaceticus* K-4, є активація природної нафтоокиснювальної мікрофлори під впливом поверхнево-активних речовин.

Одержані результати показують перспективність використання препаратів ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* K-4, для очищення води від високих концентрацій нафти. Суттєвою перевагою таких препаратів є можливість їх застосування у вигляді постферментаційної культуральної рідини, а також висока ефективність очищення від нафти за низької концентрації поверхнево-активних речовин.

Висновки. Таким чином, у результаті проведеної роботи встановлено, що поверхнево-активні речовини, синтезовані *A. calcoaceticus* K-4, інтенсифікують процеси деструкції нафти в результаті стимуляції природної нафтоокиснювальної мікрофлори. Показана можливість використання для ефективного (деградація на 80–95 % нафти у концентрації 2,6 г/л) очищення води невисоких

концентрацій препаратів ПАР у вигляді культуральної рідини (5 %).

ЛИТЕРАТУРА

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

2. Hua Z., Chen J., Lun S., Wang X. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. // *Water Res.* — 2003. — V. 37, № 17. — P. 4143–4150.

3. Lu X.X., Zhang X., Li G.H., Zhang W.H. Production of biosurfactant and its role in the biodegradation of oil hydrocarbons // *J. Environ. Sci. Health Part A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* — 2003. — V. 38, № 3. — P. 483–492.

4. Bodour A.A., Guerrero-Barajas C., Jiorle B.V., Malcomson M.E. Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium* sp. strain MTN11 // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2004. — V. 70, № 1. — P. 114–120.

5. Пирог Т.П., Антонюк С.І. Особливості синтезу поверхнево-активних речовин штамом *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 // *Наукові праці НУХТ.* — 2007. — № 22. — С. 50–53.