

А.П. МОРОЗОВА

Національний університет харчових технологій

ДОСЛІДЖЕННЯ ЗДАТНОСТІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* ЕК-1 ДО АКТИВІЗАЦІЇ ДЕСТРУКЦІЇ НАФТИ У ВОДІ

Встановлено, що використання препаратів поверхнево-активних речовин (ПАР) *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 дало змогу інтенсифікувати процеси очищення води від нафти. Підбрано оптимальні параметри процесу, що забезпечували зниження вмісту нафти у зразках на 93% через 30 діб. Показано, що за присутності препаратів ПАР спостерігалася активація природної мікрофлори води.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, біологічна деструкція, нафтоокиснювальні мікроорганізми.

Установлено, что использование препаратов поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 давало возможность интенсифицировать процессы очистки воды от нефти. Подобраны оптимальные параметры процесса, которые обеспечивают снижение содержания нефти в образцах на 93 % через 30 суток. Показано, что в присутствии препаратов ПАВ наблюдалась активация природной микрофлоры воды.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, биологическая деструкция, нефтеокисляющие микроорганизмы.

Процеси видобутку, транспортування, переробки нафти постійно супроводжуються технологічними і аварійними викидами сировини у навколишнє середовище, що призводить до забруднення та порушення екосистем різної інтенсивності. Особливо небезпечними є аварії на нафтопроводах. Це зумовлено складністю впровадження ефективного захисту довкілля по всій довжині магістралей. У результаті таких викидів нафтові забруднення створюють залпове навантаження на природні середовища, що ускладнює їх швидку деградацію природною мікрофлорою. Погортаючи у ґрунт та воду, великі кількості нафти порушують екологічну рівновагу систем, що проявляється в інгібуванні життєдіяльності більшості груп живих організмів.

Природне розкладання вуглеводнів нафти є дуже тривалим процесом. Прогресуючі темпи забруднення навколишнього середовища вимагають розробки екологічно безпечних та економічно обґрунтованих заходів, спрямованих на інтенсифікацію

процесів деструкції вуглеводнів. На теперішній час найефективнішим способом біоремедіації ґрунту та води вважають використання комплексних препаратів нафтоокиснювальних мікроорганізмів та синтезованих ними поверхнево-активних речовин (ПАР) [1, 3]. Використання ПАР дає змогу суттєво підвищити біодоступність вуглеводнів для нафтоокиснювальних мікроорганізмів та аборигенної мікрофлори забруднених екосистем. Крім того, поверхнево-активні речовини здатні підвищувати гідрофобність клітинної стінки біодеструкторів, що суттєво полегшує асиміляцію нафти та нафтопродуктів клітинами. Така схема очистки відрізняється від інших технологій низькими експлуатаційними витратами та високою надійністю, оскільки забезпечує практично повну деградацію органічних сполук в умовах *in situ* [5].

У попередніх дослідженнях із забрудненого нафтою ґрунту було ізольовано штам бактерій, ідентифікований як *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1. Цей

штам характеризується здатністю синтезувати ПАР на гідрофобних (гексадекан, рідкі парафіни) та гідрофільних (глюкоза, етанол) субстратах. Встановлено оптимальні умови культивування *R. erythropolis* ЕК-1 на гексадекані, що забезпечують підвищення у шість разів показників синтезу поверхнево-активних речовин. Хімічний склад ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 та поверхнево-активні властивості культуральної рідини описані раніше [4].

Метою даної роботи було визначення ефективності використання поверхнево-активних препаратів *R. erythropolis* ЕК-1 у процесах очищення води від нафти, дослідження ролі нативної мікрофлори води та нафтоокиснювальних бактерій *R. erythropolis* ЕК-1 у процесах утилізації нафти.

R. erythropolis ЕК-1 вирощували на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 – 1,0; 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; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; рН 6,8 – 7,0. Як джерело вуглецю і енергії використовували гексадекан у концентрації 2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовували культуру з середини експоненційної фази росту (48 год), вирощену на середовищі наведеного складу з 1 % гексадекану. 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 28 °С упродовж 168 год.

Як препарати ПАР використовували нативну та простерилізовану культуральну рідину *R. erythropolis* ЕК-1, а також супернатант культуральної рідини.

Використання як одного з варіантів препаратів ПАР простерилізованої культуральної рідини зумовлено двома причинами: 1) виключити вплив клітин родокока на деградацію нафти і оцінити роль у цьому процесі саме ПАР; 2) максимально вивільнити асоційовані з клітинами ПАР та отримати препарат з вищими поверхнево-активними властивостями. Культуральну рідину стерилізували при 112 °С 30 хв.

Для одержання супернатанту, нативну культуральну рідину центрифугували упродовж 30 хв (5000g), надосадову рідину зливали і піддавали автоклавуванню за наведених вище умов. Таку термообробку здійснювали для знищення клітин продуцента.

Дослідження процесу очищення води від нафти за участю препаратів ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 проводили на модельній водоймі, якою слугувала ємність з 2 л бюветної води. На поверхню води наносили 2,6 г/л 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 експериментів через п'ять днів експозиції здійснювали повторну обробку води препаратами ПАР у концентрації 5 %.

Загальну кількість живих клітин (КУО/мл) у бюветній воді (до забруднення нафтою), а також кожні 6 днів упродовж місяця у всіх зразках визначали за методом Коха на середовищі МПА.

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

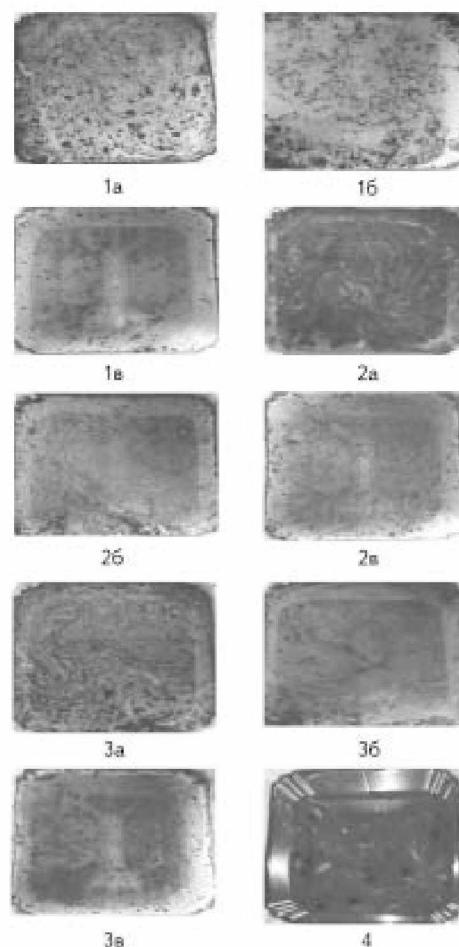


Рис. 1. Деструкції нафти різними препаратами поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1

1 — нативна культуральна рідина, 2 — стерильна культуральна рідина, 3 — супернатант культуральної рідини, 4 — контроль (без обробки). Тривалість експозиції: а — 1 доба, б — 12 діб, в — 30 діб. Умови процесу: концентрація препаратів — 5 % (за об'ємом); кількість процедур обробки препаратом — одна.

Візуальний аналіз зразків показав, що максимальний рівень біодеструкції нафти досягається за умови обробки забруднених зразків води нативною культуральною рідиною (рис. 1.) Струйне внесення препарату спричиняло емульгування нафтової плівки з подальшим утворенням крупнодисперсної емульсії або окремих краплин нафти. Через 6—7 днів експерименту плівка втрачала маслянистий блиск, зникав характерний мазутний запах, на поверхні води з'являлися поодинокі зони, вільні від нафти. Через 10 днів у зразках починав випадати невеликий осад, змінювалися структура та колір (з чорного на сірий) периферійних ділянок плівки. Вже на 12 добу експерименту близько 70 % поверхні води були повністю вільними від нафти (рис. 1.) Надалі швидкість процесу деструкції поступово знижувалась, залишки нафти коагулювали і частково осідали на дно ємності. З

внесенням до модельного водоймища стерильної культуральної рідини або супернатанту культуральної рідини процес очищення набував іншого характеру. Так, упродовж 17 діб чітко виражених змін у структурі нафтової плівки не спостерігалось (рис. 1.) Натомість, на 18—20 добу розпочинався активний процес деструкції нафти. В усіх досліджуваних зразках, починаючи з 25 доби, видимих змін на поверхні модельних водойм не спостерігали.

Дані щодо кількісного визначення залишкової нафти на 30 добу експерименту наведено у табл. 1. Встановлено, що максимальний рівень деструкції нафти (93,1 %) досягається за внесення нативної культуральної рідини *R. erythropolis* ЕК-1 у забруднені нафтою зразки води. За використання стерильної культуральної рідини та супернатанту культуральної рідини цей показник коливався в межах 79,2—83,8 % (табл. 1.)

Таблиця 1

**Показники очищення води від нафти
препаратами поверхнево-активних речовин
Rhodococcus erythropolis ЕК-1**

Препарат ПАР	Концентрація препарату ПАР, %	Концентрація залишкової нафти, г/л	Ступінь деструкції нафти, %
Нативна культуральна рідина	5	0,18	93,08
	15	0,17	93,46
Стерильна культуральна рідина	5	0,54	79,23
	15	0,50	80,77
Супернатант культуральної рідини	5	0,42	83,85
	15	0,39	85,00
Без обробки	—	2,6	0

Примітка. Наведено дані для одноразової обробки води препаратами ПАР.

Збільшення концентрації препаратів ПАР до 15 % не призводило до інтенсифікації процесу очищення забруднених водоймищ (табл. 1.) Зокрема, внесення такої кількості препаратів дало змогу підвищити ступінь деструкції нафти лише на 0,4—1,5 % залежно від їх виду.

З метою активізації процесів деструкції нафти нами було запропоновано провести повторну обробку поверхні водойм препаратами *R. erythropolis* ЕК-1. Так, додаткове внесення 5% нативної культуральної рідини (5 доба) дало змогу скоротити тривалість процесу очищення та підвищити ступінь деградації нафти (на 15—20 %), порівняно з однократною обробкою (рис. 2). У той же час повторна обробка водойм стерильною культуральною рідиною та супернатантом культуральної рідини майже не супроводжувалася інтенсифікацією процесів деструкції нафти.

З літературних джерел відомо [6], що деструкція різних груп вуглеводнів нафти відбувається під дією хімічних і біологічних агентів (зокрема, нативної мікрофлори середовища). Так, парафіни є стійкими до хімічного впливу, проте легко піддаються фермента-

тивному окисненню. Циклопарафіни і ароматичні вуглеводні, навпаки, є чутливішими до хімічного окиснення, ніж до біологічної дії.

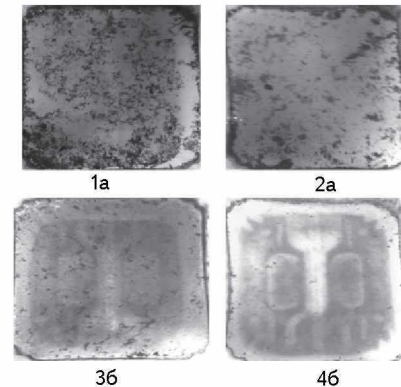


Рис. 2. Залежність ступеню деструкції нафти від режиму обробки зразків поверхнево-активними препаратами *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1
1, 3 — одноразова обробка, 2, 4 — дворазова обробка.
Тривалість експозиції: а — 12 діб, б — 30 діб.
Використовувались препарати ПАР у вигляді нативної культуральної рідини. Концентрація — 5%

Нами була зроблена спроба визначити роль біологічних факторів (нативна мікрофлора води, нафто-окиснювальні бактерії *R. erythropolis* ЕК-1) у процесі очищення води від нафти в модельних умовах.

Використання стерильної артезіанської води для створення модельної водойми, призводило до пригнічення процесів деструкції нафти. Так, за внесення нативної культуральної рідини, помітні зміни у структурі нафтової плівки були зафіксовані вже на восьму добу експерименту (рис. 3), проте подальші процеси деградації нафти різко гальмувалися. За використання препаратів ПАР у вигляді простерилізованої культуральної рідини та супернатанту ступінь розкладання нафти не перевищував 15—20% після 30 діб експозиції (рис. 3.) Висока стійкість нафти в стерильних зразках води може свідчити про участь у її розкладанні «аборигенної» мікрофлори води. Натомість наявність у препараті (нативна культуральна рідина) живих клітин *R. erythropolis* ЕК-1 посилювало ефективність процесів деструкції нафти.

Мікробіологічний контроль показав, що нативна мікрофлора води була представлена чотирма морфотипами бактерій: № 1 — палички правильної форми довжиною 2,0—4,0 мкм неспоруютьовальні, при рості на МПА утворювали округлі, матові, випуклі з рівними краями колонії діаметром 3—5 мм кремового кольору; № 2 — палички правильної форми довжиною 1,0—3,0 мкм, неспоруютьовальні, на МПА утворювали округлі, прозорі, випуклі з рівними краями колонії діаметром 2—4 мм; № 3 — палички правильної форми довжиною 1,0—2,0 мкм, неспоруютьовальні, при рості на МПА утворювали округлі, випуклі з рівними краями колонії діаметром 1—2 мм жовтого кольору.

Показано, що внесення мікробних препаратів стимулювало розвиток природної мікрофлори води.

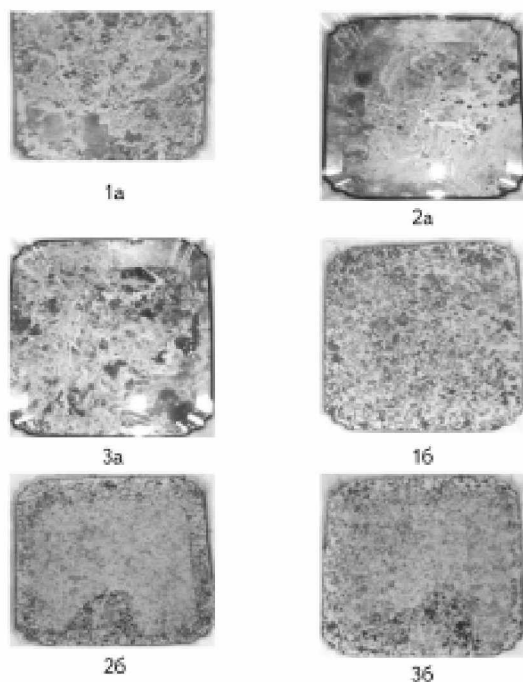


Рис. 3. Вплив нативної мікрофлори артезіанської води на процеси деструкції нафти 1 — нативна культуральна рідина, 2 — стерильна культуральна рідина, 3 — супернатант культуральної рідини. Тривалість експозиції: а — 8 діб, б — 30 діб. Здійснювали дворазову обробку препаратами ПАР до їх кінцевої концентрації 10%

Так, вже на 6 добу в усіх дослідних зразках, оброблених препаратами, концентрація бактерій підвищувалась на чотири — п'ять порядків і досягала $6 \cdot 10^7 - 1 \cdot 10^8$ КУО/мл (табл. 2), у той час як у контролі (зразки, не оброблені препаратами) цей показник не перевищував $3,6 \cdot 10^3$ КУО/мл. На нашу думку, таке збільшення концентрації нативної мікрофлори зумовлено підвищенням доступності вуглеводнів нафти (джерело вуглецю) в результаті їх солюбілізації та емульгування поверхнево-активними речовинами і додатковим внесенням у середовище діамонійфосфату (джерело азоту та фосфору).

Таблиця 2

Кількісні зміни мікрофлори модельних водойм за внесення препаратів поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1

Препарат ПАР	Мікрофлора води, КУО/мл			
	Тривалість експозиції, діб			
	3	6	12	18
Нативна культуральна рідина	$2,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^8$	$1,4 \times 10^9$	$1,5 \times 10^8$
Стерильна культуральна рідина	$4,3 \times 10^4$	6×10^7	$7,1 \times 10^8$	3×10^7
Супернатант культуральної рідини	$5,0 \times 10^5$	6×10^7	$2,9 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
Без обробки	$3,6 \times 10^3$	$3,6 \times 10^3$	$1,1 \times 10^2$	89

Примітка: концентрація препаратів — 5%; кількість процедур обробки препаратом — одна.

Відомо [2], що наявність у середовищі легкозасвоюваних сполук сприяє залученню до процесу біодеструкції нафти мікроорганізмів, здатних до співокиснення. При цьому розширюється спектр мікро-

організмів, що беруть участь у цьому процесі та повніше використовуються можливості мікробіоценозу.

Висновки. У результаті проведеної роботи встановлено, що використання поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1 дає змогу інтенсифікувати процеси очищення води від нафти. Максимальний ступінь деструкції нафти досягався за умови використання ПАР у вигляді нативної культуральної рідини. Підібрано оптимальні параметри процесу (концентрація препарату — 5%, двократна обробка на першу та п'яту добу, метод внесення — розпилення), що дає змогу знизити вміст нафти у зразках на 93%. Натомість, ефективність очищення води від нафти за використання простерилізованої культуральної рідини та супернатанту культуральної рідини не перевищувала відповідно 79 та 83%. Встановлено, що за присутності препаратів ПАР спостерігається активація природної мікрофлори води.

ЛІТЕРАТУРА

1. Волченко Н.Н., Карасева Э.В. Скрининг углеводородокисляющих бактерий — продуцентов поверхностно-активных веществ биологической природы и их применение в опыте по ремедиации нефтезагрязненной почвы и нефтешлама // Биотехнология. — 2006. — №2. — С. 57—62.
2. Киреева Н.А., Онегова Т.С., Жданова Н.В. Изучение возможности применения биопрепарата бельвитамил для ускорения деструкции нефти в почве и водоеме // Биотехнология. — 2003. — №5. — С.77—80.
3. Малаховска-Юши А., Покинсьброда Т., Карпенко Е. Разложение бензпирена почвенными микроорганизмами в присутствии гликолипидов, продуцируемых штаммом *Pseudomonas* sp. PS-17 // Биотехнология. — 2007. — №3. — С. 69—73.
4. Пирог Т.П., Волошина И.Н., Игнатенко С.В., Вильданова-Марцишин Р.В. Синтез поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на среде с гексадеканом // Биотехнология. — 2005. — №6. — С. 27—36.
5. Плешакова Е.В., Дубровская Е.В., Турковская О.В. Приемы стимуляции аборигенной нефтеокисляющей микрофлоры // Биотехнология. — 2005. — №1. — С. 42—50.
6. Хабибуллина Ф.М., Шубаков А.А., Арчегова И.Б., Романов Г.Г. Исследование способности нефтеокисляющих бактерий утилизировать углеводороды нефти // Биотехнология. — 2002. — №6. — С.57—62.

Одержана редколлегією 11.06.08 р.