

ТЕХНОЛОГІЯ ПРОДУКТІВ БРОДІННЯ, БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА ФАРМАЦІЯ

УДК 579.222.2

О.Я. Карпенко¹, І.С. Богун¹, Ю.Б. Козуб², Р.І. Вільданова³, В.П. Новіков¹

¹Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології,
²ВАТ “Геотехнічний інститут”,

³Відділення ФХГК ІнФОВ ім. Л.М. Литвиненка НАН України

ЗАСТОСУВАННЯ ПРИРОДНОГО СОРБЕНТУ ТА ПАР МІКРОБНОГО ПОХОДЖЕННЯ В ПРОЦЕСАХ БІОРЕМЕДІАЦІЇ ҐРУНТУ

© Карпенко О.Я., Богун І.С., Козуб Ю.Б., Вільданова Р.І., Новіков В.П., 2010

Досліджено процес біоремедіації нафтозабрудненого ґрунту з використанням природної асоціації мікроорганізмів-деструкторів нафтопродуктів. Як стимулятори процесу були вибрані природний мінерал глауконіт та мікробні поверхнево-активні речовини. Показано ефективність запропонованих методів для очищення забруднених об'єктів.

The process of oil-contaminated soil bioremediation using natural association of microorganisms-destructors of oil products was studied. Natural mineral glauconite and microbial surface active substances were selected as stimulators of the process. The efficiency of the proposed methods for the remediation of contaminated objects was shown.

Постановка проблеми. Забруднення довкілля продуктами промисловості, зокрема нафтопродуктами, призводить до пригнічення флори і фауни, руйнування структури ґрунтів і погіршення загального екологічного стану. Забруднені території є непридатними для життя тварин і рослин, а також не можуть використовуватися у господарстві. Серед забруднень найнебезпечнішими є ті, що важко розкладаються, тобто стійкі до зовнішніх впливів та мікрофлори. До таких речовин належить нафта і продукти її переробки. Ці забруднювачі можуть мігрувати ґрунтовим профілем, тим самим значно збільшуючи зону первинного забруднення. Хімічне забруднення ґрунту відбувається фактично на усіх стадіях технологічного процесу нафтовидобутку. Під час потрапляння нафти і нафтопродуктів у ґрунт відбуваються глибокі і часто незворотні зміни його фізичних, морфологічних, фізико-хімічних, мікробіологічних властивостей, а іколи й істотна перебудова ґрунтового профілю. Зміна властивостей ґрунту під час забруднення призводить до витіснення повітря нафтою, погіршення постачання води та поживних речовин, що є основною причиною гальмування росту рослин та їх загибелі. Ґрунти, насичені нафтопродуктами, втрачають здатність вбирати і утримувати вологу.

Аналіз попередніх досліджень і публікацій. Для вирішення проблеми забруднення довкілля, зокрема ґрунтів, застосовують різноманітні методи – хімічну та механічну обробку, спалювання, захоронення тощо [1]. Серед найперспективніших та екологічно найприйнятніших методів провідну роль відіграє біоремедіація, тобто відновлення довкілля за допомогою мікроорганізмів [2]. З цією метою застосовують окремі штами або асоціації мікроорганізмів, що здатні утилізувати забруднення (органічні речовини, важкі метали тощо) [3]. Однак часто умови забрудненого об'єкта унеможливають провести мікробну очистку з потрібною ефективністю. Це зумовлено токсичним впливом високих концентрації забруднень на мікрофлору, низькою доступністю забруднень у зв'язку із їх значною гідрофобністю. Зважаючи на це, доцільним є використання так званих

стимуляторів процесу біоремедіації, які в той чи інший спосіб здатні підвищити його ефективність. У літературі широко описана здатність ПАР різного походження стимулювати процеси очищення довкілля [4, 5]. Цю дію можна пояснити кількома можливими шляхами впливу на процес – солюбілізація важкорозчинних у воді забруднень, десорбція забруднень із ґрунтової матриці, а також стимуляція мікрофлори [6].

Природний мінерал глауконіт має добрі сорбційні властивості [7, 8] і застосовується під час розливів нафти та нафтопродуктів [9, 10]. Його також додають як природне добриво або як біологічно активну добавку у корм сільськогосподарських тварин, оскільки він являє собою джерело мікро- та макроелементів. Відомий також його стимулювальний вплив на мікрофлору [11].

Мета роботи – вивчити процесу біологічної очистки ґрунту, забрудненого нафтопродуктами, а також вплив на нього природного мінералу глауконіту, ПАР мікробного походження та їх комбінації.

Експериментальна частина. Ґрунт. Для проведення досліду використовувався чистий садовий ґрунт. Проби ґрунту підсушували, штучно забруднювали фракцією сирової нафти з температурою кипіння >150 °С до концентрації 3 % ваг.

Асоціації мікроорганізмів. Для проведення біоремедіації використовували природну асоціацію мікроорганізмів-деструкторів нафтопродуктів, що була виділена з об'єктів із застарілими забрудненнями на території НГВУ «Долина нафтогаз», у середовищі з нафтовими вуглеводнями як джерелом вуглецю. Асоціацію отримували методом накопичувальної культури [12]. Було визначено, що до складу асоціації входять чотири штами, які здатні ефективно розкласти нафту та нафтопродукти. Культуральну рідину як інокулят додавали до забрудненого ґрунту у концентрації 5 % ваг.

Поживне середовище. Для підтримки життєдіяльності мікроорганізмів та ефективної біодеградації забруднень використовували модифіковане мінеральне поживне середовище Шишкіної-Троценко [13], г/л: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; KH_2PO_4 – 1,6; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 2,2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,02.

Глауконіт (ТУ У 02497915.001-2001) було надано НВКП “Екоресурс” (Хмельницька обл., Україна). Речовина являє собою глинистий мінерал, що належить до групи гідролідів підкласу шаруватих силікатів. До його складу входять іони калію, заліза, магнію, алюмінію, фосфору, кальцію та широкий спектр мікроелементів.

БіоПАР. Для стимуляції процесу біодеградації використовували поверхнево-активний біокомплекс, що складається із рамноліпиду та полісахаридів, виділений з культуральної рідини штаму *Pseudomonas sp.* PS-17, у концентрації 0,05 г/кг.

Процес біоремедіації проводили у горщиках по 300 г ґрунту. Були випробувані такі варіанти: 1 – контроль; 2 – мікробна асоціація, глауконіт (2 г/кг) та мінеральне середовище; 3 – мікробна асоціація, глауконіт (5 г/кг) та мінеральне середовище; 4 – мікробна асоціація, глауконіт (10 г/кг) та мінеральне середовище; 5 – мікробна асоціація, глауконіт (5 г/кг), біоПАР (0,05 г/кг) та мінеральне середовище; 6 – мікробна асоціація, глауконіт (10 г/кг), біоПАР (0,05 г/кг) та мінеральне середовище. Для підтримання належного рівня вологості та аерації ґрунт зволожували і ретельно перемішували 2 рази на тиждень. Дослід проводили протягом трьох місяців.

Визначення концентрації залишкових нафтопродуктів у ґрунті проводили 4 рази за методикою [14] у нашій модифікації. Пробу ґрунту 30 г після проведення процесу біодеградації екстрагували чотирьохлористим вуглецем (30 мл) двічі, очищали екстракт від полярних вуглеводнів на хроматографічній колонці з оксидом алюмінію, розчинник упарювали, концентрацію нафтопродуктів визначали гравіметричним методом.

Визначення дегідрогеназної активності проводили 4 рази впродовж процесу біодеградації за методикою [15] у нашій модифікації. Для цього 6 г проби ґрунту змішували з 1 мл 3 % трифенілтетразолій хлориду, 2,5 мл води і 0,05 г кальцію карбонату та інкубували 24 год за температури

37 °C. Після інкубування проби екстрагували ацетоном (15 мл), екстракти проаналізовано фотометричним методом при 485 нм (Shimadzu UVmini-1240, Shimadzu Corp., Japan).

Визначення біомаси мікроорганізмів деструкторів нафтопродуктів проводили методом серійних розведень з ґрунтових екстрактів на агаризованому поживному середовищі Шишкіної-Троценко [16].

Результати та обговорення. Проби ґрунту аналізувалися 4 рази впродовж експерименту на вміст залишкових нафтопродуктів, рівень дегідрогеназної активності та біомасу мікрофлори, що здатна окислювати вуглеводні.

Результати визначення концентрації залишкових нафтопродуктів показали, що найефективнішими виявилися варіанти досліду №№ 5 і 6, у яких, крім асоціації мікроорганізмів-деструкторів була застосована комбінація двох концентрацій глауконіту та біоПАР. Отже, під час додавання мікробних ПАР у варіанти з глауконітом було виявлено додаткове стимулювання біоремедіації порівняно з варіантами із застосуванням лише глауконіту. Загалом усі варіанти виявилися значно ефективнішими за контроль. Результати показано на рис. 1.

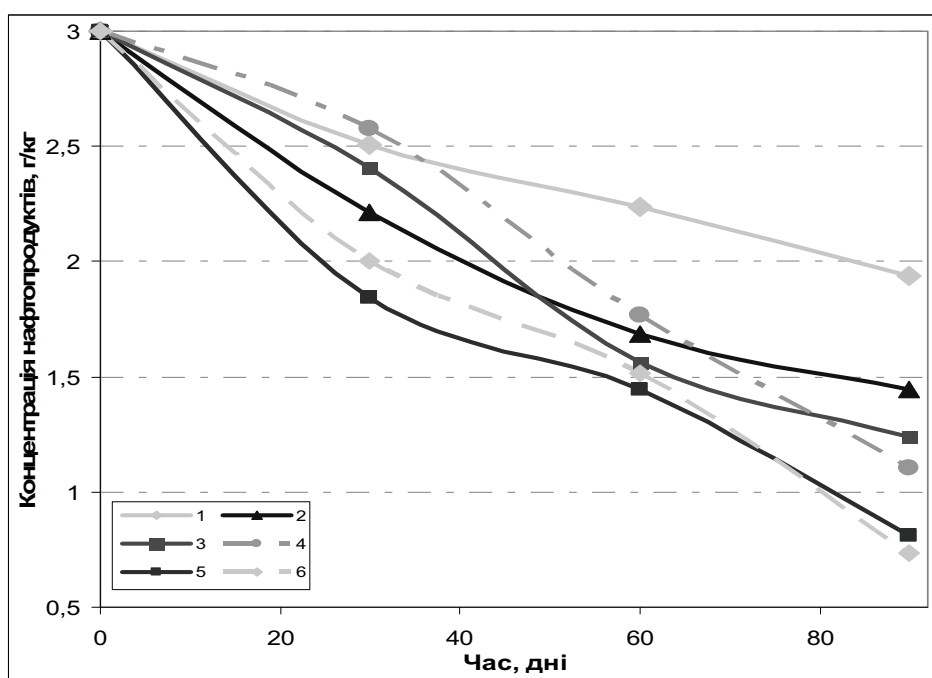


Рис. 1. Зміна концентрації нафтопродуктів у забрудненому ґрунті впродовж експерименту, 1–6 – варіанти досліду: 1 – контроль; 2 – мікробна асоціація, глауконіт (2 г/кг); 3 – мікробна асоціація, глауконіт (5 г/кг); 4 – мікробна асоціація, глауконіт (10 г/кг) та мінеральне середовище; 5 – мікробна асоціація, глауконіт (5 г/кг), біоПАР (0,05 г/кг) та мінеральне середовище; 6 – мікробна асоціація, глауконіт (10 г/кг), біоПАР (0,05 г/кг) та мінеральне середовище

Дегідрогеназа є одним з ключових ферментів у життєдіяльності мікроорганізмів, тому дегідрогеназна активність може бути використана як одна з характеристик активності мікроорганізмів-деструкторів органічних забруднень. Аналіз дегідрогеназної активності впродовж експерименту виявив, що приблизно через 30 днів після початку експерименту спостерігали її максимальні значення. Це можна пояснити підвищенням активності мікроорганізмів-деструкторів, які пристосувалися до умов забрудненого ґрунту і почали активно накопичувати біомасу і утилізувати забруднення (нафтопродукти) як джерело вуглецю та енергії. Із зниженням концентрації нафтопродуктів активність мікроорганізмів поступово зменшується; це зумовлено недостатністю поживних речовин для їх активного росту і життєдіяльності. Результати дослідження дегідрогеназної активності показано на рис. 2.

Третім параметром, за яким аналізувався процес біоремедіації забрудненого ґрунту, була кількість мікроорганізмів-деструкторів вуглеводнів у досліджуваних зразках ґрунту. Аналізуючи результати можна зробити висновок, що кількість мікроорганізмів корелювала з дегідрогеназною активністю і частково із залишковою концентрацією нафтопродуктів у пробах ґрунту. Мікробіологічні дослідження показали, що приблизно через 40 днів після початку експерименту спостерігалася найбільша кількість мікроорганізмів-деструкторів, що було спричинено їхнім активним ростом. У кінці досліду кількість мікроорганізмів-деструкторів, особливо у варіантах 4–6, зменшувалася, що пов'язано із значною утилізацією нафтових вуглеводнів. У контрольному варіанті спостерігалось повільне зростання кількості мікроорганізмів-деструкторів. Це можна пояснити поступовим пристосуванням автохтонної мікрофлори до умов забруднення. Результати мікробіологічних досліджень наведено у таблиці.

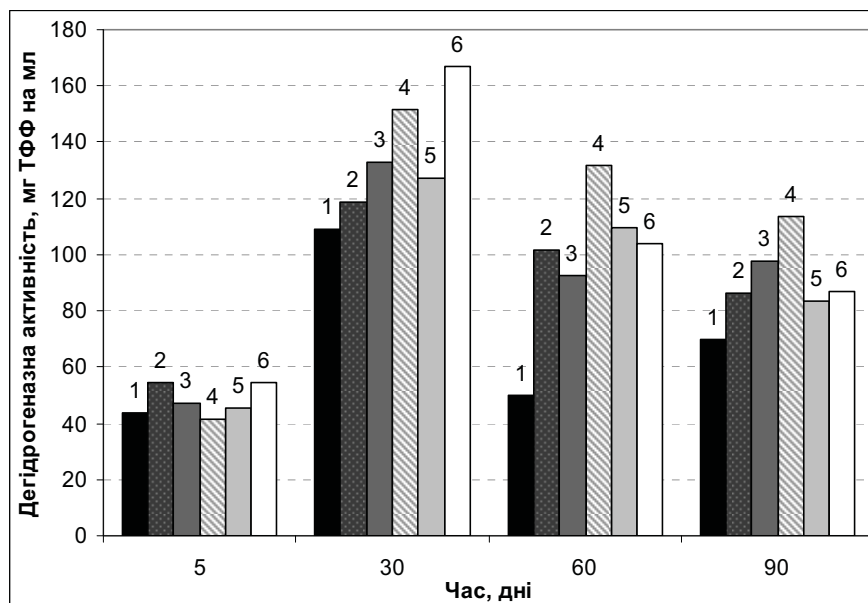


Рис. 2. Дегідрогеназна активність у пробах забрудненого ґрунту протягом проведення експерименту, 1–6 – варіанти досліду: 1 – контроль; 2 – мікробна асоціація, глауконіт (2 г/кг) та мінеральне середовище; 3 – мікробна асоціація, глауконіт (5 г/кг) та мінеральне середовище; 4 – мікробна асоціація, глауконіт (10 г/кг) та мінеральне середовище; 5 – мікробна асоціація, глауконіт (5 г/кг), біоПАР (0,05 г/кг) та мінеральне середовище; 6 – мікробна асоціація, глауконіт (10 г/кг), біоПАР (0,05 г/кг) та мінеральне середовище

Мікроорганізми-деструктори вуглеводнів у процесі експерименту

Варіант експерименту	Кількість мікроорганізмів-деструкторів, КУО*/мл			
	10 днів	40 днів	70 днів	90 днів
1	?	$4,3 \times 10^4$	$5,4 \times 10^5$	$6,8 \times 10^5$
2	$3,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$9,6 \times 10^6$
3	$2,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$
4	$2,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$9,5 \times 10^6$
5	$3,0 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$8,6 \times 10^6$
6	$2,9 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$9,0 \times 10^6$

*КУО – колонієутворювальні одиниці.

Висновки. Встановлена ефективність комплексних методів очищення забруднених нафтопродуктами ґрунтів із використанням природної асоціації мікроорганізмів-деструкторів нафтопродуктів, глауконіту та біоПАР. Показано, що під час застосування біоПАР разом з глауконітами мікроорганізми-деструктори здатні ефективно утилізувати вуглеводні нафти: зменшення концентрації нафтопродуктів досягнуло 70–80 % порівняно з початковим забрудненням. Розроблені методи можуть бути рекомендовані для відновлення об'єктів, забруднених нафтою та нафтопродуктами.

1. Balba M.T., Al-Awadhi N. and Al-Daher R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation // *Journal of Microbiological Methods*. – 1998. – 32 (2). – P. 155–164. 2 Song H.-G., Wang X. and Bartha R. Bioremediation Potential of Terrestrial Fuel Spills // *Appl Environ Microbiol.* – 1990. – 56(3). – P. 652–656. 3. M. Vidali. Bioremediation. An overview // *Pure Appl. Chem.* – 2001. – Vol. 73. – No. 7. – P. 1163–1172. 4. Rouse J.D., Sabatini D.A., Suflita J.M., Harwell J.H. Influence of surfactant on microbial degradation of organic compounds // *Crit Rev Environ Sci Technol.* – 1994. – 24. – P. 325–370. 5. Bognolo G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons // *Colloid. and surface A: Physical Chemistry and Engineering.* – 1999. – 152. – P. 41–52. 6. Kosaric N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation // *Food Technol Biotechnol.* – 2001. – 39. – P. 295–304. 7. Hyung-Min Choi, Jerry P. Moreau. Oil sorption behavior of various sorbents studied by sorption capacity measurement and environmental scanning electron microscopy. *Microscopy Research and Technique.* – Vol. 25. – Is. 5-6. – P. 447–455. 8. E. Srasra and M. Trabelsi-Ayedi. Textural properties of acid activated glauconite // *Applied Clay Science*, – Vol. 17. – Is. 1-2, July 2000. – P. 71–84. 9. Аренс В.Ж. Эффективные сорбенты для ликвидации нефтяных разливов / В.Ж. Аренс, О.М. Гридин // *Экология и промышленность России.* – 1997. – № 3. – С. 8–11. 10. Лобачева Г.К., Колодницкая Н.В., Воронович Н.В. Изучение свойств глауконита для очистки почв от хлорорганических загрязнений и рассмотрение его как стимулятор роста растений // *Актуальные проблемы географии и геоэкологии.* – 2009. – Вып. 2 (6). 11. Щеглова Н., Лісова Н., Карпенко О. Стимуляція біосинтезу полісахаридів культури *Enterobacter sp.* // *Вісник Львівського університету. Серія біологічна.* – 2008. – Вип. 48. – С. 135–139. 12. Karpenko E.V., Vildanova R.I., Shcheglova N.S. The prospect of using bacteria of genus *Rhodococcus* and microbial surfactants for degradation of oil pollutants // *Appl. Biochem. and Microbiol.* – 2006. – V.42. – P.156–159, MAIK, Nauka/Interperiodica. 13. Kolwzan B. Bioremediacja gleb skazonych produktami naftowymi wraz z osenaekotoksykologiczna – OWPW. – Wroclaw, 2005. – S. 212. 14. РД 52.18.647-2003. Методические указания. Определение массовой доли нефтепродуктов в почвах. Методика выполнения измерений гравиметрическим методом. 15. Casida, L., Klein, D.A., Santoro, T. Soil dehydrogenase activity // *Soil Science.* – 1964. – 98. – P. 319–328. 16. Сеги И. Методы почвенной микробиологии. – М.: Колос, 1983. – 285.