

ТЕХНОЛОГІЯ ПРОДУКТІВ БРОДІННЯ, БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА ФАРМАЦІЯ

УДК 579.222.2

О.Я. Карпенко, Н.С. Щеглова^{*}, В.П. Новіков
Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології;
^{*}Відділення фізико-хімії і технології горючих копалин ІнФОВ НАН України

БІОЛОГІЧНА ОЧИСТКА ҐРУНТУ ВІД НАФТОВИХ ВУГЛЕВОДНІВ З ВИКОРИСТАННЯМ БІОПАР ТА ПЕРОКСИДУ КАЛЬЦІЮ

© Карпенко О.Я., Щеглова Н.С., Новіков В.П., 2009

Досліджено вплив пероксиду кальцію, поверхнево-активних речовин природного походження, а також ключових елементів мінерального живлення (азоту і фосфору) у різних співвідношеннях на процес біоремедіації нафтозабрудненого ґрунту. Показано стимулюючий вплив біоПАР, пероксиду кальцію та біогенних солей на діяльність природних асоціацій нафтоокиснювальних мікроорганізмів. Вищезгадані речовини можна рекомендувати для застосування у технологіях очистки ґрунту від нафтових забруднень.

The influence of calcium peroxide, surface-active substances of natural origin as well as various compositions of key elements of mineral nutrition (nitrogen and phosphorous) on the process of bioremediation of oil-contaminated soil was determined. The stimulating effect of biosurfactant, calcium peroxide and biogenous salts on the activity of the natural associations of oil-oxidizing microorganisms was shown. The above mentioned compounds may be recommended for application in the technologies of the remediation of soil from petroleum contaminations.

Постановка проблеми та її зв'язок з важливими науковими завданнями. Забруднення ґрунтів органічними речовинами, зокрема нафтою і нафтопродуктами, негативно впливає на екологічний стан довкілля, а також несе в собі небезпеку для здоров'я людини. Потрапляючи у ґрунт, нафтові вуглеводні підвищують його токсичність, значно погіршують структуру, пригнічують ріст і розвиток рослин, активність ґрунтової мікрофлори. Забруднений нафтопродуктами ґрунт є не тільки непридатним для сільського господарства, але й створює загрозу забруднення ґрунтових вод і поширення забруднень.

Сьогодні одним з найперспективніших методів очистки та відновлення забруднених ґрунтів і водних ресурсів є біоремедіація – застосування мікроорганізмів-деструкторів та їх асоціацій. Основною проблемою є підвищення ефективності мікробної ремедіації за допомогою різноманітних чинників. Особливо цікавим є використання різних речовин – стимуляторів та акселераторів процесу біоремедіації.

У роботі представлено результати модельного експерименту з біоремедіації нафтозабрудненого ґрунту. Для очистки застосовували природну мікробну асоціацію, виділену з нафтозабрудненого ґрунту і селекційовану в лабораторних умовах методом накопичувальної культури. Як стимулюючі агенти використовували ПАР мікробного походження та пероксид кальцію (хімічний окисник та додаткове джерело аерації), а також біогенні солі як елементи мінерального живлення для мікроорганізмів.

Аналіз попередніх досліджень і публікацій. Відомо, що передумовою успішного процесу біологічної очистки ґрунту від органічних забруднень є доступність забруднюючого агента (часто гідрофобного) для ґрунтової мікрофлори [1, 2]. Важливим фактором активності мікроорганізмів-деструкторів є достатній рівень аерації всього об'єму ґрунту [3]. Показано, що біоПАР можуть бути ефективними стимуляторами процесів біодеструкції забруднень ґрунтів та водних ресурсів [4, 5]. Завдяки своїй здатності до солюбілізації гідрофобних органічних речовин, а також впливу на проникність клітинних мембран мікроорганізмів біосурфактанти значно підвищують біодоступність забруднень для мікробної деструкції. Також відомий їх стимулюючий ефект на ферментативну активність мікроорганізмів [6]. Для інтенсифікації біоремедіації шляхом підсилення аерації середовища можуть бути використані хімічні окисники у низьких концентраціях [1], тоді як у більших концентраціях їх успішно використовують як основний чинник ремедіації забруднених об'єктів [7, 8]. Серед хімічних окисників особливої уваги заслуговує пероксид кальцію, який є слабо розчинним у воді, і завдяки цьому може мати пролонговану дію як стимулятор аерації при забрудненні ґрунту [9].

Метою роботи є дослідження впливу пероксиду кальцію, а також елементів поживного середовища у різних співвідношеннях на процеси біодеградації нафтових забруднень у ґрунті.

Проведення експерименту. Ґрунт. Проби ґрунту для проведення досліджень були взяті з ділянки, забрудненої розливом сирої нафти на території НГВУ «Долинанaftогаз» (м. Долина, Івано-Франківська обл.). Концентрація нафтопродуктів у ґрунті була визначена за методом, наведеним в пункті 2.5 і становила 8%. Для ефективної біоремедіації концентрацію нафтопродуктів було знижено до 4% шляхом перемішування забрудненого ґрунту з чистим у співвідношенні 1:1.

Асоціації мікроорганізмів. Як головний фактор біоремедіації було використано природну асоціацію мікроорганізмів деструкторів нафтопродуктів, що була виділена з об'єктів із застарілими забрудненнями на території НГВУ «Долинанaftогаз», на середовищі з нафтовими вуглеводнями як джерелом вуглецю. Асоціацію було отримано методом накопичувальної культури [10]. Було визначено, що до складу асоціації входять 3 штами, що здатні ефективно розкласти нафту та нафтопродукти. Культуральну рідину як інокулят додавали до забрудненого ґрунту у концентрації 5% ваг.

Поживне середовище. Для нормальної життєдіяльності мікроорганізмів до забрудненого ґрунту додавали мінеральне поживне середовище у двох варіантах, виходячи із співвідношення C:N:P – 100:10:1 та 100:5:1 відповідно, г/л:

1) NH_4NO_3 – 3, 43

K_2HPO_4 – 0, 67;

2) NH_4NO_3 – 1, 71

K_2HPO_4 – 0, 67.

БіоПАР. Як біосурфактант було використано природний біокомплекс, що складається із рамноліпиду та полісахаридів альгінатної природи, виділений з культуральної рідини штаму *Pseudomonas sp.* PS-17, у концентрації 0,1 г/л.

Пероксид кальцію. До ряду експериментальних варіантів було додано пероксид кальцію (CaO_2) у концентрації 0,1 г/кг (варіант №8), 0,3 г/кг (варіант №9) та 0,5 г/кг (варіант №10).

Процес біоремедіації проводили у горщиках по 300 г ґрунту у кожному. Були випробувані такі варіанти експерименту: 1 – контроль; 2 – мінеральне середовище 1; 3 – мінеральне середовище 1 та біоПАР; 4 – мінеральне середовище 1, біоПАР та мікробна асоціація; 5 – мінеральне середовище 2; 6 – мінеральне середовище 2 та біоПАР; 7 – мінеральне середовище 2, біоПАР та мікробна асоціація; 8 – мінеральне середовище 1, пероксид кальцію (0,1 г/кг) та мікробна асоціація; 9 – мінеральне середовище 1, пероксид кальцію (0,3 г/кг) та мікробна асоціація; 10 – мінеральне

середовище 1, пероксид кальцію (0,5 г/кг) та мікробна асоціація. Для підтримання належного рівня аерації та вологості ґрунт зволожували і ретельно перемішували два рази на тиждень. Аналіз дегідрогеназної активності ґрунту було проведено на 30-й день експерименту. Дослід проводили 45 днів, після чого визначили концентрацію залишкових нафтопродуктів.

Визначення концентрації залишкових нафтопродуктів у ґрунті. Аналіз залишкових нафтопродуктів проводили за методикою [11] у нашій модифікації. Для цього пробу ґрунту після проведення процесу біодеградації екстрагували чотирьохлористим вуглецем двічі, очищали екстракт від полярних вуглеводнів на хроматографічній колонці з оксидом алюмінію, розчинник упарювали, концентрацію нафтопродуктів визначали гравіметричним методом.

Визначення дегідрогеназної активності під час біодеградації. Аналіз дегідрогеназної активності ґрунту проводили під час процесу біодеградації за методикою [12] у нашій модифікації. Для цього проби ґрунту інкубувалися з трифенілтетразолій хлоридом 24 год. Після інкубування проби було проекстрагувано ацетоном, екстракти проаналізовано спектрофотометричним методом (Shimadzu UVmini-1240, Shimadzu Corp., Japan).

Результати та їх обговорення. Аналіз результатів експерименту свідчить про ефективність досліджених підходів для очистки ґрунтів від нафтопродуктів. Встановлено стимулюючий вплив біоПАР та CaO₂ на процес біоремедіації. Визначення концентрації залишкових нафтопродуктів у ґрунті після 45 діб експерименту показало, що додавання стимуляторів біоремедіації призвело до зменшення ступеня забруднення на 40–53% порівняно з контролем і на 15–20% порівняно з варіантами без додавання біоПАР та пероксиду кальцію. Показники дегідрогеназної активності вказують на підвищення активності цього ферменту при додаванні стимулюючих речовин.

Біодеградація нафтопродуктів у ґрунті. Результати аналізу залишкових нафтопродуктів наведені у таблиці.

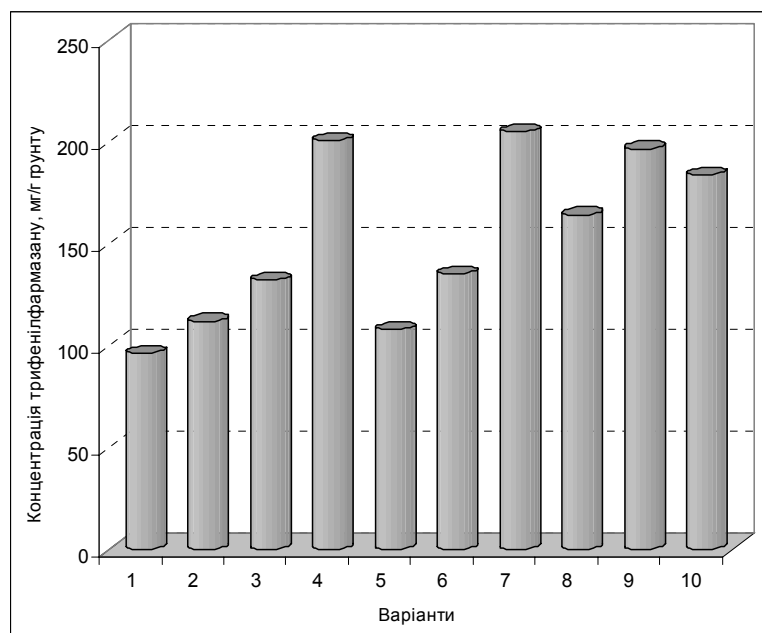
Залишкові концентрації нафтопродуктів у ґрунті після біодеградації

Варіанти досліджу	Концентрація нафтопродуктів у ґрунті, г/кг	Зниження початкової концентрації забруднення, %
1	36,047	90,12
2	30,458	76,14
3	24,158	60,39
4	18,846	47,11
5	31,885	79,71
6	22,620	56,55
7	14,471	36,18
8	22,006	55,01
9	17,857	44,64
10	18,273	45,68

Найкращий результат показав варіант №7 із застосуванням асоціації мікроорганізмів деструкторів, ПАР мікробного походження та біогенних солей у співвідношенні С:N:P – 100:5:1 (NH₄NO₃ – 1, 71 г/л, K₂HPO₄ – 0, 67 г/л). Також достатньо ефективним виявився варіант №4, аналогічний варіанту №7, але із співвідношенням елементів поживного середовища 100:10:1. Аналіз отриманих результатів дає змогу зробити висновок про більшу доцільність використання у біоремедіації елементів С:N:P у співвідношенні - 100:5:1 (рисунок).

Дегідрогеназна активність забрудненого ґрунту у процесі біодеградації. Дані аналізу дегідрогеназної активності, проведеного під час біодеградації, показали високі показники у варіантах 4 і 7, а також у варіантах із застосуванням CaO₂.

Показники дегідрогеназної активності переважно корелюють з показниками концентрації залишкових нафтових вуглеводнів, що підтверджує ключову роль дегідрогенази у процесах ферментативного розкладу вуглеводнів нафтоокиснюючими бактеріями.



Дані аналізу дегідрогеназної активності у дослідних варіантах

Висновки. Можна зробити висновок, що додавання пероксиду кальцію стимулювало ферментативну активність ґрунтових мікроорганізмів у процесі біодеградації. Мікробна ремедіація забруднених ґрунтів у комбінації з біоПАР та з хімічними окисниками є ефективним методом відновлення навколишнього середовища, що створює перспективу її застосування на практиці.

Робота була виконана у межах проекту УНТЦ №3494.

1. Kosaric N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation // *Food Technol Biotechnol.* 2001;39:295–304.
2. Embar K, Forgacs C, Sivan A. The role of indigenous bacterial and fungal soil populations in the biodegradation of crude oil in a desert soil // *Biodegradation.* 2006 Aug;17(4):369-77.
3. M. Vidali. Bioremediation. An overview // *Pure Appl. Chem., Vol. 73, No. 7, pp. 1163–1172, 2001.*
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;24:325–370.
5. G. Bognolo - Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons // *Colloid. and surface A: Physical Chemistry and EGINEERING,* 1999, 152, 41-52.
6. M. Suchanek, J. Kostal, K. Demnerova, B. Kralova. Use of sodium dodecyl sulphate for stimulation of biodegradation of n-alkanes without residual contamination by the surfactant // *International Biodeterioration & Biodegradation.* V. 45, 1-2, 2000, P. 27-33.
7. S. Kong, R. J. Watts, J. Choi. Treatment of petroleum-contaminated soils using iron mineral catalyzed hydrogen peroxide // *Chemosphere,* V. 37, 8, 1998, P. 1473-1482.
8. Crockett E.L., Manissero C.E., Tremaine S.C., Bell P.E. The Bioremediation of Soils Containing Hydrocarbon Using Calcium Peroxide // *International Patent. WO9429242 (A1).* Publication date: 1994-12-24.
9. A. Northup, D. Cassidy. Calcium peroxide (CaO₂) for use in modified Fenton chemistry // *Journal of Hazardous Materials.* Vol. 152, Issue 3, 15 April 2008, P. 1164-1170.
10. Вільданова-Марцишин Р.І., Покинсьброда Т.Я., Карпенко О.Я., Новиков В.П. Скринінг мікроорганізмів-деструкторів вуглеводнів із забруднених нафтопродуктами об'єктів Західної України // *Вісник Нац. ун-ту «Львівська політехніка» «Хімія, технологія речовин та їх застосування».* – 2008. – № 609. – С.135–140.
11. РД 52.18.647-2003. Методические указания. Определение массовой доли нефтепродуктов в почвах. Методика выполнения измерений гравиметрическим методом.
12. Casida, L., Klein, D.A., Santoro, T. Soil dehydrogenase activity // *Soil Science,* 1964, 98, p. 319-328.