

УДК 551.510
Ф 32

АНАЛІЗ ЧИННИКІВ, ЯКІ ВПЛИВАЮТЬ НА МІКРОБІОЛОГІЧНУ БІОДЕСТРУКЦІЮ ВУГЛЕВОДНІВ НАФТИ

Д. В. Федюкіна, аспірант;
Г. Г. Трохименко, канд. біол. наук, доц.

Національний університет кораблебудування, м. Миколаїв

Анотація. Проаналізовано процес мікробіологічної деградації вуглеводнів нафти й нафтопродуктів. Особливу увагу сконцентровано на біологічних чинниках і чинниках навколишнього середовища, які впливають на ступінь та швидкість біодеградації цих вуглеводнів у навколишньому природному середовищі.

Ключові слова. біодеградація, нафтопродукти, мікроорганізми, вуглеводні, нафтове забруднення, окиснення.

Аннотация. Проанализирован процесс микробиологической деградации углеводородов нефти и нефтепродуктов. Особое внимание сконцентрировано на биологических факторах и факторах окружающей среды, которые воздействуют на степень и скорость биодеградации этих углеводородов в окружающей природной среде.

Ключевые слова. биодеградация, нефтепродукты, микроорганизмы, углеводороды, нефтяное загрязнение, окисление.

Abstract. The process of microbiological degradation of oil hydrocarbons and products is analyzed. Special attention is paid to biological and environmental factors, which influence the level and rate of biodegradation of these hydrocarbons in the environment.

Keywords. biodegradation, oil products, microorganism, hydrocarbon, oil pollution, oxidation.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Серед значної кількості шкідливих речовин антропогенного походження, що потрапляють у поверхневі водойми, нафтопродуктам належить одне з перших місць. Це пов'язано з їхньою здатністю утворювати токсичні сполуки у ґрунтах, поверхневих та підземних водах. Вуглеводні важко розкладаються у зв'язку з їхньою складною хімічною природою, високою стійкістю і стабільністю до факторів довкілля (температури, сонячної радіації, вологості тощо). Якщо забруднення нафтою характерні для районів її видобутку, переробки й транспортування, то забруднення нафтопродуктами, такими, як бензин, дизельне паливо, мастила, мазут, є

більш поширеним. Для перерахованих вище продуктів гранично-допустимі концентрації (ГДК) на 1–2 порядки нижче розчинності. У зв'язку з цим їхнє потрапляння у водоносні горизонти робить непридатними для споживання великі обсяги питної води.

Екологічна ситуація, що пов'язана з нафтовим забрудненням поверхневих вод, підземних горизонтів та ґрунтів у Миколаївській області досить напружена. Промисловий комплекс і багатогалузеве сільське господарство здійснюють значний негативний вплив на довкілля. Незважаючи на те, що обсяги виробництва продукції в області за останні десятиріччя значно знизилися, ступінь техногенного навантаження на основні

складові екосистеми залишається суттєвим. Вміст нафтопродуктів у поверхневих водах річки Південний Буг та Бузького лиману в межах міста Николаєва, за даними обласного гідрометеоцентру, продовжує зберігатися

на високому рівні хімічного забруднення і становив 6...7 ГДК у 2010 році, в середньому в поверхневому шарі 0,22 мг/дм³ (4 ГДК), у придонному — 0,28 мг/дм³ (5,6 ГДК) (рис. 1).

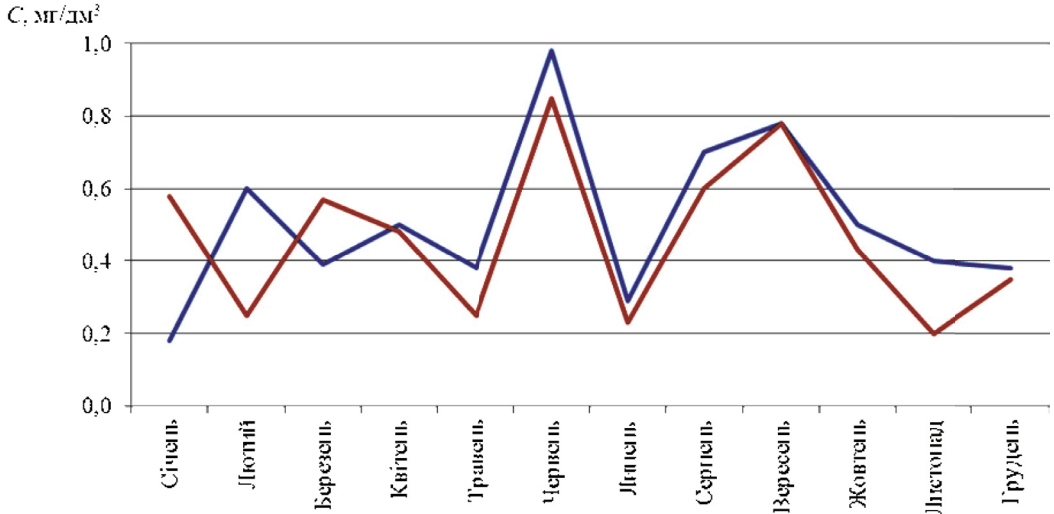


Рис. 1. Максимальна концентрація нафтопродуктів в акваторії міста Николаєва:
— за 2009 р.; — за 2010 р.

МЕТОЮ РОБОТИ є не лише оцінка ситуації щодо нафтового забруднення в акваторії міста Николаєва, але й аналіз ефективності біодеструкції вуглеводнів різними штамми мікроорганізмів та мікробіологічними препаратами, а також дослідження впливу різних чинників (як біотичних, так і абіотичних) на процес біодеградації нафтових вуглеводнів.

ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ

Відомі способи очищення природного середовища від нафти потребують покращення їхніх експлуатаційних можливостей, комплексного розв'язання проблем знешкодження забруднень незалежно від умов середовища, відповідності нормам екологічної безпеки. На сьогодні існує велика кількість методів очищення води від вуглеводнів, але найбільш дешевим, безпечним та перспективним є біологічний.

Природне очищення довкілля від нафти і нафтопродуктів може відбуватися протягом тривалого часу, в середньому 10...20 років

[1, 3]. Для інтенсифікації цього процесу широко застосовуються методи очищення, засновані на використанні біопрепаратів, до складу яких входять адаптовані до забруднювача активні штами мікроорганізмів — деструкторів, мінеральні компоненти та сорбенти. Це дозволяє скоротити строки відновлення природного середовища з десятків років до кількох місяців [2].

Більшість синтетичних органічних речовин, у тому числі й нафтопродукти, можуть підлягати біодеградації, що робить біологічні методи очищення альтернативним вирішенням багатьох екологічних проблем. Здатність швидко адаптуватися до нових умов навколишнього середовища, широкий набір ферментних систем дають змогу використовувати різні органічні сполуки як джерело енергії та вуглецю і тим самим надавати деструкції токсичні, канцерогенні та мутагенні речовини, до складу яких входять і нафтопродукти. Для прискорення біологічної деструкції вуглеводнів широко використовуються мікробіологічні методи, які полягають у внесенні в забруднене середовище

виділених з природних еконіш активних штамів вуглеводнеокиснювальних мікроорганізмів або створених на їхній основі препаратів. Часто це єдина можливість збереження екологічної чистоти навколишнього середовища без порушення природних біоценозів. Зі зменшенням концентрації вуглеводнів у воді відбувається активізація місцевого мікробіоценозу, інтенсифікується метаболізм забруднених водойм, що забезпечує повне відновлення рівноваги екосистем, яка існувала до забруднення.

Самоочищення екосистем, забруднених нафтою та нафтопродуктами, — це стадійний біогеохімічний процес трансформації, пов'язаний з процесом відновлення біоценозу. У результаті біотичних взаємодій відбувається біотрансформація фізико-хімічних форм забруднень та їх руйнування у процесі біохімічного окиснення. Для різних природних зон тривалість окремих стадій цих процесів різна. Важливу роль відіграє склад нафти, наявність солей, початкова концентрація забруднюючих речовин. Мікробне окиснення вуглеводнів — один з провідних чинників процесу елімінації нафти. У результаті діяльності мікроорганізмів відбуваються трансформація нафтового забруднення до простих сполук, накопичення нової органічної речовини та як наслідок — наростання біомаси мікроорганізмів і, тим самим, включення вуглеводневих компонентів у загальний кругообіг вуглецю у водному середовищі [1, 3–5].

При потрапленні в морське середовище нафта і нафтопродукти швидко припиняють існування як вихідні субстрати та розділяються на агрегатні фракції у вигляді плівок, розчинених і зважених форм, емульсій, акумульованих у водних організмах сполук, причому домінуючою міграційною формою зазвичай є емульгована і розчинена нафта. У перші години появи нафтового забруднення домінуючими є фізико-хімічні процеси, інтенсивність яких залежить від властивостей конкретного виду нафти, її густини, в'язкості, коефіцієнта теплового розширення, температури повітря і сонячного освітлення. Проте фізичні фактори є лише фоном, на якому відбувається корінна деградація нафти хімічним або біологічним шляхом.

Усі реакції мікробіологічного перетворення вуглеводнів є окисними процесами. Для біодеградації необхідна наявність у середовищі електронних акцепторів: в аеробних умовах — кисню, в анаеробних — нітратних і сульфатних сполук. Кінцевими продуктами біотрансформації в аеробних умовах є CO_2 і H_2O , в анаеробних — CO_2 , H_2O , CH_4 , H_2S [3]. Біохімічні процеси деградації нафти за участю мікроорганізмів включають у себе декілька типів ферментних реакцій на основі оксигенази, дегідрогеназ і гідролаз, які здійснюють ароматичне та аліфатичне гідроксилування, окисне дезамінування, гідроліз та інші біохімічні перетворення вихідних нафтових речовин і проміжних продуктів їхнього розпаду. Окиснення вуглеводнів більшістю мікроорганізмів здійснюється за допомогою адаптивних ензимів у присутності молекулярного кисню. Проміжними продуктами при розпаді вуглеводнів найчастіше є спирти, альдегіди і жирні кислоти. Споживання нафтових вуглеводнів аеробами супроводжується утворенням високомолекулярних спиртів, нафтових кислот, альдегідів та ефірів, а також утворенням низькомолекулярних органічних сполук, зокрема легких жирних кислот, які можуть використовуватися анаеробними бактеріями — метаноутворюючими та сульфатовідновлювальними [4].

За сприятливих умов нафтоокиснюючі бактерії руйнують практично всі вуглеводні від метану до найважчих залишків. Проте найбільш важкі фракції нафти важче піддаються впливу. Частково це обумовлено малою здатністю до диспергування, а також тим, що вони мають меншу площу поверхні. Парафіни легко піддаються деградації, проте ароматичні вуглеводні є найбільш прийнятними джерелами вуглецю та енергії для бактерій. У морському середовищі окиснення нафти проходить за наступними шляхами: пряме окиснення до CO_2 , H_2O і органічних речовин; перетворення нафти в такі поверхнево-активні речовини, як жирні кислоти, емульгуючі, більш стійкі компоненти сирої нафти; окиснення до проміжних форм [5]. Продукти неповного окиснення вуглеводнів (гідропероксиди, спирти, кетони, альдегіди,

ліпіди, органічні кислоти, амінокислоти, нуклеотиди, пігменти, цукри, полісахариди, феноли), у свою чергу, є субстратом для мікробної атаки. Вибірковість бактерій може бути зумовлена характером розподілу їх у водних середовищах і механізмом проникнення у клітину. Згідно з існуючими уявленнями, кінетика накопичення вуглеводнів у клітинах має ступінчастий характер. Перша стадія — сорбція на поверхні клітини, друга — метаболічна, при якій відбувається дифузія вуглеводнів через клітинну стінку і розчинення в ліпідах цитоплазматичної мембрани.

До основних чинників, які впливають на доступність вуглеводнів для бактеріального окиснювання, належать такі: наявність у мікроорганізмів відповідної системи ферментів, відносна розчинність вуглеводню, придатність вуглеводню до транспорту через клітинну оболонку, відсутність специфічної токсичної дії на цитоплазму самого вуглеводню чи продуктів його окиснення [3].

У навколишньому середовищі нафтопродукти головним чином розкладаються бактеріями, водоростями, дріжджами та

грибами, але ця здатність дуже варіабельна: 6...82 % у грибів, 0,13...50 % у бактерій, 0,003...100 % у морських бактерій. Найбільш активними у біодеградації вуглеводнів є бактерії *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas* spp. та коринеформи. Серед дріжджів і грибів, здатних розкласти вуглеводні, виділені *Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* spp., із ґрунтів — *Trichoderma* та *Mortierella* spp. *Aspergillus* та *Penicillium* spp. [6] (рис. 2).

Окрім мікроорганізмів здатні метаболізувати лише обмежену кількість вуглеводневих субстратів. Їх сукупність з усіма можливими ензиматичними властивостями може ефективніше, ніж поодинокі види, руйнувати комплексну суміш вуглеводнів у воді (рис. 3).

Основною проблемою при мікробіологічній біодеструкції є підвищення ефективності мікробної ремедіації за допомогою різноманітних факторів: температури, аерації, ступеня дисперсії нафти, кислотно-лужної рівноваги, наявності біогенних сполук тощо.

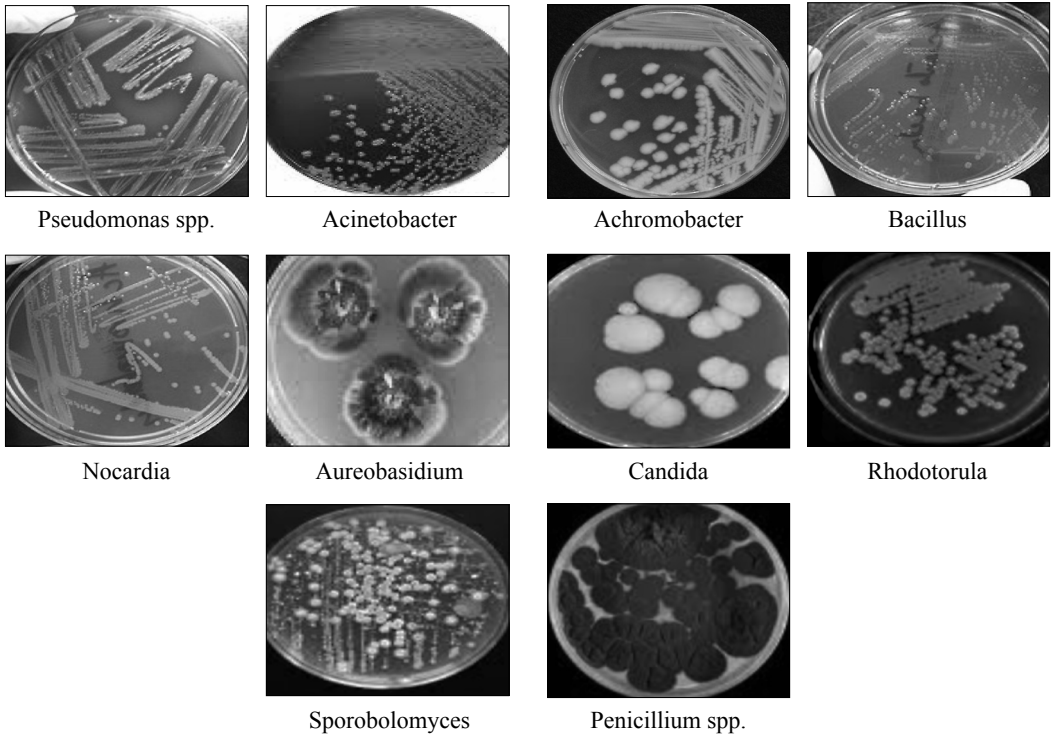


Рис. 2. Основні штами мікроорганізмів — деструкторів нафтопродуктів

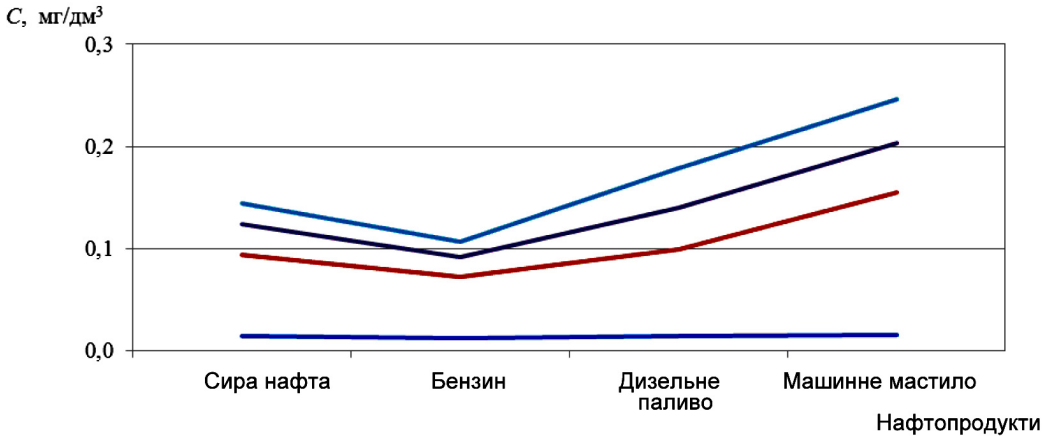


Рис. 3. Ефективність деструкції нафтових вуглеводнів мікроорганізмами у стаціонарних умовах:

— початкова концентрація; — монокультура; — трикультура; — контроль

Велике значення має склад нафтопродуктів, компоненти яких класифікують за категоріями: аліфатичні, аlicиклічні, ароматичні та поліциклічні ароматичні вуглеводні. Аліфатичні вуглеводні є яскравим прикладом органічних речовин, що підлягають аеробній біодеградації. Найлегше руйнуються алкани, далі алкени й алкіни. Компоненти, які складаються з прямих ланцюгів, легше деградують, ніж ті, які мають розгалужені ланцюги. Біодеградація алканів найкраще відбувається для компонентів, у яких є 10 атомів карбону в ланцюзі. Дуже короткі алкани (метан, етан, пропан і бутан) присутні як гази і можуть бути використані як первинні субстрати чи кометаболіти деградації [7]. Ароматичні вуглеводні можуть деградувати під час аеробних і анаеробних біологічних процесів. Поліциклічні ароматичні вуглеводні (ПАВ) складаються з двох і більше ароматичних кілець. Зі збільшенням числа кілець розчинність сполук у воді зменшується, а стійкість до деградації — збільшується. Такі вуглеводні можуть піддаватися аеробній і анаеробній біодеградації [6, 7].

У процесі біологічного окиснення нафти важливе значення має наявність у середовищі оптимальних концентрацій нітрогену і фосфору, тому для більш ефективного очищення мікроорганізмами (м/о) забруднених нафтою екосистем разом з ними вносять і відповідні мінеральні компоненти (табл. 1).

Таблиця 1. Деструкція нафти (концентрація 700 мг/л) сумішшю культур при внесенні різних форм і концентрацій азотних добрив [7]

Варіант дослідження	Концентрація азоту, мг		
	100	200	300
Суміш м/о + вуглеамонійні солі	359	420	451
Суміш м/о + аміачна селітра	389	407	421
Суміш м/о + натрієва селітра	300	332	321
Суміш м/о + нітроаммофоска	396	487	520

Викиди вуглеводнів у водне середовище, яке містить низьку концентрацію неорганічних поживних речовин, часто призводять до підвищення співвідношення карбон/нітроген та/або співвідношення карбон/фосфор у середовищі, що у свою чергу може негативно впливати на зростання і поділ мікроорганізмів.

Наявність достатньої кількості доступних форм нітрогену та фосфору може бути лімітуючим фактором при біодеградації сирової нафти або бензину у водах. Додавання фосфатів, сечовини, комбінованих азотно-фосфорно-калійних добрив або солей амонію та ортофосфорної кислоти може суттєво посилювати біодеградацію цих нафтопродуктів.

Швидкість біодеградації нафти залежить від ступеня дисперсії її у воді, а також доступності забруднюючого агента (часто гідрофобного) для водної мікрофлори та належного рівня аерації. Важливу роль відіграють

біологічні поверхнево-активні речовини, які є стимуляторами процесів біодеградації забруднень водних екосистем. Завдяки своїй здатності до солюбілізації гідрофобних органічних речовин, а також впливу на проникність клітинних мембран мікроорганізмів, біосурфактанти значно підвищують біодоступність забруднень для мікробної деструкції. Крім того, вони стимулюють ферментативну активність мікроорганізмів.

Темпи розкладання мікроорганізмами багатьох органічних сполук у водному середовищі пропорційні концентрації цих компонентів. Швидкість мінералізації таких високомолекулярних ароматичних вуглеводнів, як нафталін і фенатрен, більше пов'язана з їхньою розчинністю у воді, ніж із загальною концентрацією цих сполук. Мікробіологічна деградація довгих алканів, для яких розчинність менша ніж 0,01 мг/л, відбувається швидше, ніж темпи розчинення цих вуглеводнів [8, 9]. Швидкість деградації таких вуглеводнів прямо залежить від площі поверхні часточок цих вуглеводнів, з якими може прямо взаємодіяти мікробна клітина — редуцент. Отже, при утворенні емульсії цих вуглеводнів площа поверхні суттєво зростає, підвищуючи таким чином швидкість деградації. Із цього випливає, що темпи біодеградації багатьох вуглеводнів не залежать від їхньої концентрації на відміну від більшості розчинних органічних сполук. Підвищені концентрації вуглеводнів, які не

диспергують у воді, а утворюють плівку, можуть спричинити пригнічення біодеградації за рахунок обмеження доступу кисню та поживних речовин до мікроорганізмів.

На біодеградацію нафтопродуктів впливає температура та рН середовища. Низькі температури збільшують в'язкість нафти, зменшують леткість токсичних коротколанцюгових алканів і збільшують їхню розчинність у воді. Усе це пригнічує біодеградацію нафтопродуктів. Для нафтоокиснюючих мікроорганізмів температурний градієнт в інтервалі 0...+40 °С дорівнює 3,0, тобто при збільшенні температури в зазначеному інтервалі на кожні 10 °С швидкість утилізації вуглеводнів зростає в три рази. Лише незначні кількості нафти можуть підлягати біодеградації в арктичних льодовиках і заморожених ґрунтах тундри. Підвищені температури (30...40 °С) збільшують швидкість метаболізму вуглеводнів до максимуму, але підвищують токсичну дію вуглеводнів на мембрани клітин.

Тиск відіграє важливу роль у біодеградації вуглеводнів у глибоководних умовах. Нафтопродукти, які перебувають у морях і океанах на великих глибинах, деградують під впливом бактерій дуже повільно, і стійкі фракції нафти можуть зберігатися у таких умовах кілька десятків років (табл. 2).

Поряд з перерахованими вище екологічними чинниками виникають інші, такі, як зміна хімічного складу речовини, що

Таблиця 2. Значення основних факторів, які впливають на біодеградацію нафтових вуглеводнів в умовах Південного регіону України

Показники	Оптимальні значення	Ефективність біодеградації, %	Значення, що негативно впливають на процес	Дія
Температура T, °С	23...28	80...91	+50 < T < +3	Змінює в'язкість, леткість та розчинність вуглеводнів
Аерація (на 1мг вуглеводнів), мг	3...4	83...94	–	Прискорює зростання та розмноження мікроорганізмів деструкторів
Кислотність, рН	6...7	–	6 < рН < 8	Сприяє розвитку мікроорганізмів деструкторів
Біогенні речовини	БСК*:N:P=100:5:1	78...90	–	Стимулюють процес біодеградації
ПАР	–	–	–	Перешкоджають адсорбції вуглеводнів, збільшують їх біодоступність, покращують аерацію

Продовження Таблиці 2

Показники	Оптимальні значення	Ефективність біодеструкції, %	Значення, що негативно впливають на процес	Дія
Тиск, мм рт.ст	760	50...61	–	Впливає на розчинність, леткість нафтових вуглеводнів, а також на розмноження та розвиток мікроорганізмів
Концентрація нафтопродуктів, мг/дм ³	20	–	60...80	Впливає на розмноження, зростання та видове співвідношення організмів
Солоність, дм ³	150	–	250	Впливає на розчинність, леткість нафтових вуглеводнів, а також на розмноження та розвиток мікроорганізмів

* БСК — біологічне споживання кисню.

окиснюється, зміни в структурі мікробної спільноти, поява продуктів розпаду життєдіяльності бактерій, які мають безпосередній вплив на процес біодеградації.

Отримані результати в подальшому будуть перевірятися та оцінюватися в лабораторних умовах при проведенні експериментів для прискорення деструкції нафти й нафтопродуктів при аварійних розливах у водному середовищі, а також дослідження мікроорганізмів, здатних до розкладання стійких органічних сполук, вивчення їх фізіології та метаболічних шляхів з метою прискорення видалення небезпечних речовин з навколишнього середовища.

ВИСНОВКИ

1. Здійснений комплексний аналіз існуючих даних з питання мікробіологічної біодеструкції нафтових вуглеводнів показав ступінь впливу основних біотичних та абіотичних чинників на швидкість біорозкладан-

ня вуглеводнів у навколишньому природному середовищі. Визначено, що в залежності від пори року, географічного розташування, кліматичних умов, аборигенної мікрофлори різні фактори з різною ефективністю впливають на процеси біорозкладання. Встановлено, що найбільш сприятливі значення даних параметрів у процесі деградації для умов Південного регіону України такі: температура в інтервалі 23...28 °С, аерація 3...4 мг кисню на 1 мг вуглеводнів, наявність біогенних речовин у співвідношенні N:P = 5:1, концентрація забруднювача до 20 мг/дм³.

2. Проведений аналіз різних штамів мікроорганізмів-деструкторів указав, що до найбільш активних представників належать *Achromobacter*, *Pseudomonas* spp., *Penicillium* spp. Встановлено, що сукупність різних мікроорганізмів з їх ензиматичними властивостями ефективніше, ніж окремі види, руйнує комплексну суміш вуглеводнів у воді.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- [1] Вибір активних штамів — деструкторів вуглеводнів, ізольованих із забруднених нафтою ґрунтів [Текст] / Т. М. Ногіна, В. С. Шадгорський, Т. У. Думанська [та ін.] // Вісник Ужгород. ун-ту. — Ужгород, 2001. — № 10. — С. 145–147.
- [2] Вытеснение вязкой нефти месторождения Цагаан-Элс (Монголия) с применением микроорганизмов [Текст] / Т. Гэрэлмаа, Л. И. Сваровская [и др.] // Актуальные проблемы нефтегазовой отрасли Монголии: пути их решения. — 2009. — № 1 (15). — С. 89–94.
- [3] ДСТУ 4247:20003. Нафтопродукти. Метод визначення біорозщеплюваності (СЕС L-33-A-93, NEQ). — К. : Держспоживстандарт України, 2004. — 14 с.

- [4] Коронелли, Т. В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводов в окружающей среде (обзор) [Текст] / Т. В. Коронелли // Прикладная биохимия и микробиология. — 1996. — Т. 32. № 6. — С. 579–585.
- [5] Нефтеокисляющая активность микрофлоры при биодеструкции вязкой нефти месторождения Зуунбаян [Текст] / Л. И. Сваровская, Л. К. Алтунина [и др.] // Добыча, подготовка, транспорт нефти и газа: материалы. — Томск : ИОА СО РАН, 2007. — С. 231–235.
- [6] Оценка степени биодеструкции нефти методами ИК и ЯМР спектроскопии [Текст] / Л. И. Сваровская, Д. А. Филатов [и др.] // Нефтехимия. — 2009. — Т. 49. № 2. — С. 153–158.
- [7] Трофименко, Ю. В. Пути снижения негативного воздействия масел на окружающую среду [Текст] / Ю. В. Трофименко, А. В. Касаткин // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. — 2004. — № 12. — С. 18–21.
- [8] Atlas, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective [Text] / R. M. Atlas // Microbiol. Rev. — 1981. — Vol. 45. — P. 180–209.
- [9] Numerical taxonomy and ecology of petroleum — degrading bacteria [Text] / B. Austin, J. J. Calomiris, J. D. Walker, R. R. Colwell // Appl. Environ. Microbiol. — 1977. — Vol. 34. — P. 60–68.