

УКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

На правах рукопису

УДК 631.6.02+631.461+632.122.2

СЕЛЕЗНЬОВА Маріанна Володимирівна

НАУКОВЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ТА РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ
БІОПРЕПАРАТУ ДЛЯ ОЧИЩЕННЯ ҐРУНТУ ВІД НАФТОПРОДУКТІВ

Спеціальність 03.00.23 - біотехнологія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата технічних наук

Київ - 1994

АВ 30.012

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Українському Державному
Університеті Харчових Технологій, м. Київ

Наукові керівники - Кандидат технічних наук, доцент
Стабнікова Олена Всеволодівна
- Доктор біологічних наук,
завідуючий відділом
Іванов Володимир Миколайович

Офіційні опоненти - Доктор біологічних наук,
член-кореспондент АН України
Подгорський Валентин Степанович
- Кандидат біологічних наук,
науковий співробітник
Федорик Світлана Михайлівна

Провідна організація - Інститут біоорганічної хімії
і нафтохімії АН України

Захист відбудеться "25" травня 1994 р. о 14 годині на
васіданні спеціалізованої ради Д 01.15.01 при Українському Державно-
му Університеті Харчових Технологій за адресою:
252017, м. Київ, вул. Володимирська, 68 (ауд. А-311).

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Українського
Державного Університету Харчових Технологій.

Автореферат розісланий "22" квітня 1994 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,
кандидат технічних наук, доцент

Семенова О. І.

ЛНБ України ім. В. Стефаніка



00756453 (U)

AB - 30.072

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Останнім часом проблема зменшення світових запасів органічної речовини ґрунту та його деградації, що пов'язана з високою щільністю населення, урбанізацією та індустріалізацією, набула особливої гостроти. Одним з пріоритетних забруднювачів навколишнього середовища є нафта та нафтопродукти. Відомо, що забруднення ґрунту та водоймищ нафтою дуже зросло за декілька останніх років. Кількість викидів нафти до навколишнього середовища в світі зараз досягає 6 000 000 т за рік. Попадання їх до ґрунту відбувається під час фонтанування нафтовердловин, порушень при очищенні бурових свердловин, аварійних викидів у оховищах та резервуарах з мазутом і нафтопродуктами, а також при пошкодженнях в трубопроводах. Присутність нафти та нафтопродуктів викликає сповільнення розвитку, а при великих концентраціях - загибель живих організмів ґрунту.

Забруднення нафтою та нафтопродуктами ґрунту обумовлює необхідність їх одорювання, тобто створення ефективної та економічно вигідної технології його очищення.

Мета і задачі дослідження. Метою дослідження були наукове обґрунтування та розробка технології отримання біопрепарату для очищення ґрунтів, забруднених вуглеводнями нафти.

Поставлена мета передбачала рішення наступних завдань:

- вибір мікроорганізма-деструктора як основи біопрепарату для очищення нафтозабруднених ґрунтів;
- одержання біодеградуєчих поверхнево-активних речовин (біоПАР), які мають емульгуючі та піноутворюючі властивості;
- підбір адсорбенту для мікробного компоненту та біоПАР;
- дослідження ефективності та властивостей біопрепарату в лабораторних умовах;
- випробування біопрепарату в польових умовах;
- розробка рекомендацій для виробництва та застосування біопрепарату.

Наукова новизна. Показана доцільність застосування для очищення ґрунту від хімічних забруднювачів складних по композиційному складу біопрепаратів, та розроблені наукові основи створення таких композицій.

Здійснено пошук мікроорганізмів-деструкторів нафти, відібрано активний штам, вивчені його морфо-фізіологічні, біохімічні властивості, та проведені його медико-біологічні випробування.

Запропоновано нову біодеградуєчу поверхнево-активну речовину, яка має емульгуючі і піноутворюючі властивості та одночасно є поживною основою для розвитку мікроорганізмів.

Запропоновано новий носій для мікробного компоненту та біоПАР.

На захист виносяться такі наукові положення:

- для очищення ґрунту від вуглеводнів нафти є доцільним використання складних по композиційному складу біопрепаратів, що містять мікробний компонент і біоПАР, адсорбовані на носії;
- як мікробний компонент біопрепарату можуть бути використані бактерії роду *Bacillus*, що найбільш стійкі до зміни умов навколишнього середовища;
- як носій для мікробного компоненту та біоПАР у складі біопрепарату для очищення забрудненого ґрунту доцільно використовувати перліт, який покращує структуру ґрунту, регулює його вологість та нешкідливий для навколишнього середовища;
- розроблений на основі теоретичних та експериментальних досліджень біопрепарат може бути використаний для очищення ґрунту від вуглеводнів нафти.

Практична цінність роботи обумовлена тим, що отримані біоПАР в мікробної та рослинної сировини, призначені для використання в біологічному очищенні забруднених ґрунтів. Створено біопрепарат "Лестан" для очищення нафтозабруднених ґрунтів, який складається з відбраного у результаті скринінгу активного деструктору вуглеводнів нафти штама *Bacillus megaterium 1BD*, отриманого екологічно-нешкідливого біоПАР BS-4 та носія перліту. Встановлено, що використання біопрепарату "Лестан" у вигляді біопіни для очищення ґрунту, забрудненого нафтою, дозволяє збільшити ступінь деструкції вуглеводнів нафти в 3.4 рази, порівняно з простим зрошенням ґрунту бактерійною суспензією. Встановлено, що застосування "Лестану" для обробки різних ґрунтів у вигляді пульпи дозволило досягнути ступінь очищення 91-95% при середній швидкості деградації нафти - 69-72 мг/л за добу, що перевищувало у 7.5-8.0 разів результати, отримані без використання біопрепарату. Можливе біологічне очищення забрудненої нафтопродуктами води за допомогою "Лестану", при цьому ступінь деградації нафти досягає 80 та 87% за 30 діб для прісної та морської води, відповідно. Встановлено, що використання "Лестану" для біоочищення сильнозабрудненого нафтою ґрунту, дозволило збільшити ступінь очищення ґрунту у 2.3 рази, порівняно з деградацією нафти в природних умовах мікрофлю-

рою ґрунту.

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідались на Республіканській науково-технічній конференції "Разработка и внедрение высокоэффективных ресурсосберегающих технологий, оборудования и новых видов пищевых продуктов в пищевой и перерабатывающей отрасли АПК" (Київ, 1991); Міжнародному симпозиумі "Soil decontamination using biological processes" (Франкфурт на Майні, Німеччина, 1992); І 3'їа-ді Українського мікробіологічного товариства (Одеса, 1993). По результатах досліджень опубліковано 3 друковані праці та 5 статей подані до друку.

Структура та обсяг роботи. Матеріал дисертаційної роботи викладено в 7 розділах та складається з вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів та їх обговорення, висновків, додатків. Робота викладена на 158 сторінках, вміщує 27 таблиць та 26 малюнків. Список літератури включає 188 найменувань, включаючи 98 літературних джерел зарубіжних авторів. Додаток містить копії документів, що підтверджують практичне використання результатів праці.

Матеріали і методи дослідження.

Об'єкти. В роботі використані 103 штами бактерій роду *Bacillus* видів *B.adius*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. species*, *B. sphaericus*, *B. subtilis* з колекції відділу антибіотиків Інституту мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного АН України. Головним об'єктом досліджень був штам *Bacillus megaterium 1BD*, відібраний співробітниками відділу технології біосинтезу ІМЕ АН України в асоціації мікроорганізмів, які утилізують вуглеводні нафти. Асоціація мікроорганізмів була виділена з ґрунту на території підприємств газової та нафтопереробної промисловості. Використовувалися також дріжджі *Candida tropicalis K41* з колекції ІМЕ АН України.

Середовища для культивування. Бактерії роду *Bacillus* під час експериментального скринінгу вирощували на мінеральному середовищі, яке містить, г/л: сиров нафту - 2.8; NH_4NO_3 - 1.0; MgCl_2 - 0.1; KH_2PO_4 - 3.0; K_2HPO_4 - 7.0; CaCO_3 - 1.0. Вивчення спектру утилізації вуглеводнів культурою *B. megaterium 1BD* проводилося на описаному мінеральному середовищі, яке відрізнялося вмістом вуглеводнів. У експерименті використано: гексадекан, толуол, беназол, нафталін, бензин, керосин і асфальтени в концентрації 8 г/л. Вивчення динаміки росту *B. megaterium 1BD* проводилося на мінеральному середовищі, яке містить 1% глюкози, n -парафінів, дизельного палива, або сиров нафти. Дріжджі *Candida tropicalis K41* культивували на середовищі Ріддер.

Способи культивування. Періодичне вирощування бактерій та дріжджів проводили в колбах на качалках (240 об/хв) при 30°C. Біомасу бактерій, призначену для створення біопрепарату, отримували періодичним культивуванням в лабораторних ферментерах АНК/М-2М з робочим об'ємом 5 л або в пілотному ферментері В-1 з робочим об'ємом 70 л при 25-30°C, перемішуванні 800 об/хв.

Мікробіологічні методи досліджень. Кількість спор при періодичному культивуванні *B. megaterium 1BD* визначали висівом культуральної рідини, що була попередньо інкубована при 70-75°C протягом 30 хв, на тверді живильні середовища і подальшим підрахунком колоній (Смирнов та ін., 1983).

Облік кількості клітин *B. megaterium 1BD* в ґрунті на дослідних ділянках проводився по методу Звягінцева Д.Г., при цьому ґрунтова суспензія підлягала обробці на ультразвуковій установці УЗДН-1 протягом 3 хвилин при величині струму 0.4 А та частоті коливань 22 кГц.

Аналіз біомаси. Концентрацію біомаси визначали ваговим методом (Перт, 1978). Для цього культуральну рідину центрифугували, тричі відмивали та висушували до постійної ваги при 105°C. Оптичну щільність бактерійної суспензії визначали на фотоселекториметрі ФЭК-56 М в кюветі з довжиною оптичного шляху 3 мм при довжині хвилі 540 нм.

Фізико-хімічні методи досліджень. В роботі визначалися головні характеристики носіїв, такі як насипна густина, розмір зерен, водопоглинання, водовіддача, нафтопоглинальна місткість (ГОСТ 10832-83; ТУ 39-1473-90). Мікроструктура перліту і сорбенту "Жемчуг" та розміщення на їх поверхні клітин *B. megaterium 1BD* вивчалися за допомогою електронної скануючої мікроскопії.

БіоПАР BS-4 і M-1 досліджували по хімічному складу: вологість визначали висушуванням до постійної маси; зольність - спалюванням в муфельній пічці; загальний азот - методом К'ельдаля; азот амінокислот - методом Попа та Стівенса; вміст неорганічного фосфору - методом Фіске і Субарова; калій - методом емісійної полуменевої фотометрії на аналізаторі рідини ПАЖ-2 (Фертман та ін., 1975; Новаковская та ін., 1980). Вміст цукру у м'ясі та біоПАР M-1 визначали на сахариметрі; сухі речовини - на рефрактометрі; редуковані речовини - ебулоскопічним методом; колоїдні речовини - методом Думанського А.А. та Харіна С.Е. (Силин та ін., 1977). Біодеградація ПАР визначалася прискореним методом (ХПК), методом розведення (БПК) та оцінювалося по співвідношенню БПК₅/ХПК, що виражалось в процентах (Ліурье, 1984). Амінокислотний склад BS-4 вивчали на амінокислотному аналізаторі ААА-339 (ЧРСР).

Були вивчені наступні поверхнево-активні властивості біоПАР: поверхневий натяг - методом Вільгельмі (Измайлова та ін.); піноутворююча здатність - методом Рос-Майлса (Тихомиров, 1983); емульгуюча здатність - методом Соорет та Goldenberg (Cooper et al., 1987); відмивання піску від нафти методом Gutnick (Gutnick et al., 1987). Мікроскопівання та фотографування емульсії сирої нафти, утвореної за допомогою біоПАР BS-4, здійснювалося по методиці, запропонованій Абрамзонем А.А.

Випробування біопрепарату. Дослідження ефективності застосування біопрепарату у вигляді біопіни проводилися на ґрунтових колонах з суглинним ґрунтом, забрудненим сирим нафтою. Процес очищення ґрунту здійснювався при кімнатній температурі періодичним перемішуванням ґрунту та нанесенням на її поверхню препарату у вигляді біопіни протягом шести тижнів. Можливість використання "Лестану" для обробки ґрунту у вигляді пудри вивчали на калачках в колбах Шотта, при цьому склад пудри був наступним г/л: ґрунт - 333, препарат "Лестан" - 33, сира нафта - 0.67, дизельне паливо - 1.98, NH₄NO₃ - 0.1, MgCl₂ - 0.01, K₂PO₄ - 0.1. Процес очищення відбувався впродовж 35 днів при 30°C.

Випробування препарату в польових умовах відбувалося на забруднених нафтою ділянках супіщаного ґрунту. Біологічна обробка тривала шість перших тижнів, при цьому ділянка 1 зрошувалася бактерійною суспензією *B. megaterium 1BD*; на поверхню ділянки 2 наносився біопрепарат "Лестан" в сухому вигляді (по 117 г на 1 м² поверхні); ді-

лянка 3 не оброблялася (контроль). На 1 м^2 поверхні ґрунту кожен обробку наносилося по $1.7 \times 10^{11} \pm 1.1 \times 10^9$ живих клітин *B. megaterium* 1BD.

Аналіз вмісту вуглеводнів. Визначення кількості вуглеводнів в пробах ґрунту, води та культуральної рідини проводилося за допомогою інфрачервоної спектроскопометрії на аналізаторі нафтопродуктів АН-1. Екстрагування вуглеводнів здійснювалося чотирихлористим вуглецем при кімнатній температурі. При вивченні утилізації n-алканів використовували метод газорідинної хроматографії. Екстракти аналізували на газорідинному хроматографі Chrom-5, який мівтив колонку $3\text{ м} \times 3\text{ мм}$ з подумевим іонізуючим детектором (носії - хроматон N-super, 0.160-0.200 мм 5% SE-30 на хроматоні). Як рухлива фаза був використаний гелій, витрата газу - 30 мм/хв. Температура збільшувалася від 100°C до 230°C зі швидкістю 3°C за хвилину, температура випарника була 240°C.

Математична обробка результатів повного факторного експерименту та статистична обробка даних проводилися на IBM-сумісному комп'ютері. Результати, що подані графічно, були оброблені на комп'ютері за допомогою програми Grapher версії 1.75 фірми Golden Software, Inc. Функціональні залежності подані у вигляді поліномів 2-4 ступені, експонент та з допомогою кубічного згладжування.

Результати та їх обговорення.

Головним компонентом біопрепарату для очищення нафтозабруднених ґрунтів є спеціально відібрані мікроорганізми, що здатні засвоювати вуглеводні нафти як єдине джерело вуглецю та енергії. При пошуку мікробного компоненту необхідно враховувати, що відібрані мікроорганізми мають відповідати наступним вимогам:

- мати здатність до активної деструкції вуглеводнів нафти;
- бути типовими мешканцями ґрунту;
- не мати патогенності;
- належати до аеробних або факультативно-анаеробних мікроорганізмів;
- володіти здатністю переносити дії несприятливих біотичних та абіотичних факторів.

З урахуванням цих вимог були проведені теоретичний та експериментальний скринінги мікробного компоненту серед відомих бактерій-деструкторів вуглеводнів нафти. Аналіз літератури показав, що всі відомі бактерії-деструктори належать до аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів. З них найбільш типовими мешканцями ґрунту є бактерії родів *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia* і *Achromobacter*. Серед відомих мікроорганізмів особливий інтерес викликають опоруутворюючі аеробні бактерії роду *Bacillus*, тому що вони характеризуються стійкістю до несприятливих умов навколишнього середовища, високою життєздатністю та належать до

L-стратегів.

В зв'язку з цим, експериментальний скринінг проводився серед бактерій роду *Bacillus*. Відбір проводили по наступним показникам: накопичення біомаси, емульгування нафти та її споживання під час росту мікроорганізмів на мінеральному середовищі з 1% нафти як єдиного джерела вуглецю за 15 діб. Серед 103 штамів бактерій виділили дев'ять активних деструкторів: *B. subtilis B2*, *B. subtilis D1*, *B. subtilis HФ*, *B. subtilis 111D*, *B. subtilis 77ПК*, *B. species 24Б*, *B. species 13Б*, *B. megaterium 1BD*, *B. licheniformis CIP5829* (Табл. 1). Для подальших досліджень був відібраний штам *Bacillus megaterium 1BD*.

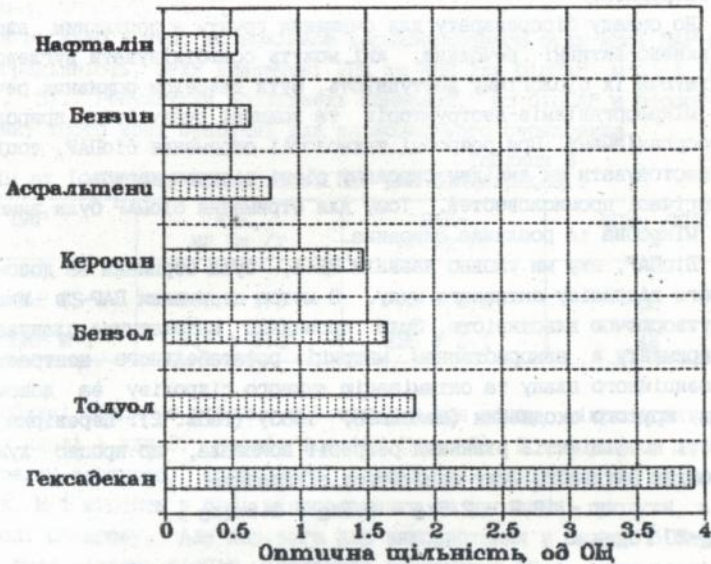
Таблиця 1
Споживання вуглеводнів нафти найбільш активними
мікроорганізмами-деструкторами роду *Bacillus*

№ п/п	Мікроорганізм	Концентрація вуглеводнів через 15 діб, мг/л	Ступінь деструкції, %
1	<i>B. licheniformis CIP 5829</i>	1050 ± 89	54.3
2	<i>B. megaterium 1BD</i>	800 ± 49	73.9
3	<i>B. species 24Б</i>	1700 ± 101	28.1
4	<i>B. species 13Б</i>	700 ± 53	89.6
5	<i>B. subtilis B2</i>	1650 ± 96	28.3
6	<i>B. subtilis D1</i>	575 ± 61	75.0
7	<i>B. subtilis HФ</i>	750 ± 48	67.4
8	<i>B. subtilis 111D</i>	1300 ± 84	43.5
9	<i>B. subtilis 77ПК</i>	1800 ± 97	21.7

*Початковий вміст вуглеводнів - 2300 ± 54 мг/л.

Штам *B. megaterium 1BD* характеризується широким спектром утилізації вуглеводнів нафти (Мал. 1). Найкращий ріст культури був зафіксований на середовищі з насиченим вуглеводнем нормальної будови - гексадеканом, хороший ріст - на середовищах з ароматичними вуглеводнями, бензолом та толуолом. Спостерігався також розвиток бактерій на середовищах з поліциклічними (нафтаїн, асфальтени) вуглеводнями, які, як правило, важко руйнуються мікроорганізмами.

З метою вивчення фізіологічних характеристик *B. megaterium 1BD* проводили періодичне культивування на мінеральних середовищах з різними джерелами вуглецевого живлення: глюкозою, n-парафінами, дизельним паливом і сировою нафтою. Встановлено, що штам характеризу-



Мал. 1. Ріст *B. megaterium* 1BD на середовищах з різними вуглеводнями

ється найбільшими питомою швидкістю росту (0.058 год^{-1}) і економічним коефіцієнтом (1.099 г/г) при культивуванні на середовищі з *n*-парафінами. Штам має також здатність до утворення емульгатору нафти, який виділяється в культуральну рідину. Встановлено, що індекс емульгування культуральної рідини при змішуванні її з *n*-парафінами (1:1) становив 42%. Під час періодичного культивування *B. megaterium* 1BD спостерігається спороутворення, що сприяє підвищенню життєздатності бактерій в природних умовах. Медико-біологічні дослідження культури показали, що вона є нетоксичною та непатогенною.

Узагальнюючи результати досліджень культури *B. megaterium* 1BD, можна зробити висновок про її непатогенність, здібності до утилізації широкого спектру вуглеводнів та до утворення біоемульгатора. Таким чином, відібраний нами штам відповідає вимогам, які пос-

тавлені до мікробних компонентів біопрепаратів для очищення ґрунту від забруднень.

До складу біопрепарату для очищення ґрунту є доцільним вводити поверхнево-активні речовини, які можуть солубілізувати вуглеводні, збільшуючи їх біологічну доступність, бути джерелом поживних речовин для мікроорганізмів-деструкторів та повинні руйнуватися природними мікроорганізмами. При розробці технології отримання біоПАР, доцільно використовувати як вихідну сировину різні відходи харчової та мікробіологічної промисловостей. Тому для отримання біоПАР були використані мікробна та рослинна сировина.

БіоПАР, яку ми умовно назвали BS-4, була отримана за допомогою лужного гідролізу активного мулу. З метою отримання ПАР з високою піноутворюючою властивістю, було проведено математичне планування експерименту з використанням матриці ротатабельного центрального композиційного плану та оптимізацію лужного гідролізу за допомогою методу круглого сходження (Максимов, 1980) (Табл. 2). Перевірка значущості коефіцієнтів рівняння регресії показала, що процес лужного гідролізу активного мулу описується рівнянням:

$$y = 12.7 - 2.6x_1 - 1.5x_2 - 1.9x_3,$$

де X_2 -20 годин.

Таблиця 2
Рівні варіювання факторів

Фактори	Кодове позначення	$x = -1.682$ (зірчаті крапки)	$x = -1$ (нижній рівень)	$x = 0$ (основний рівень)	$x = +1$ (верхній рівень)	$x = +1.682$ (зірчаті крапки)
Температура, °C	X_1	12	24	42	60	72
Тривалість гідролізу, год	X_2	4	20	44	68	84
Концентрація КОН, %	X_3	0	2	11	20	28

Було визначено оптимальні умови лужного гідролізу: температура - 21 - 28°C; тривалість гідролізу - 20 годин та концентрація лугу КОН - 5-7%.

Іншим джерелом природних ПАР, таких як амінокислоти, білки,

пектинові речовини та сапоніни, є м'ясо. Виділення біоПАР з м'ясного розчину проводилося за допомогою флотації. Отриману біоПАР назвали М-1.

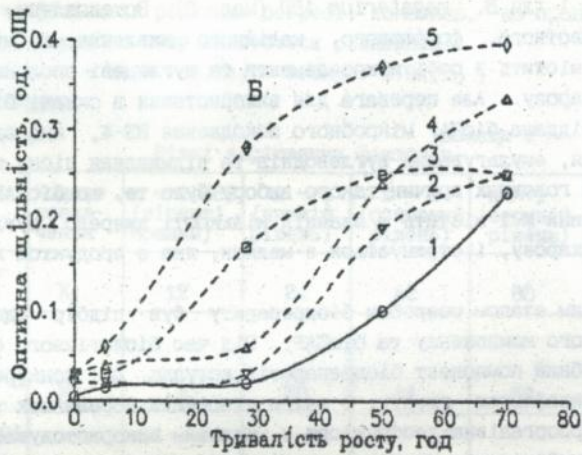
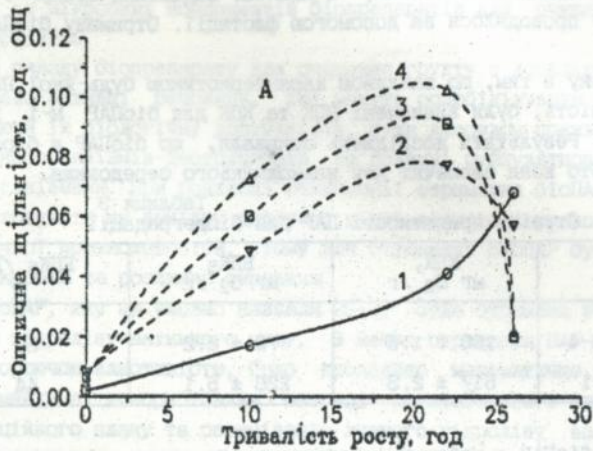
В зв'язку з тим, що важливою характеристикою будь-якої ПАР є її біодеградійність, були визначені БПК та ХПК для біоПАР М-1 і BS-4 (Табл. 3). Результати досліджень показали, що біоПАР є біологічно м'якими, тобто вони безпечні для навколишнього середовища.

Таблиця 3
Ступінь придатності ПАР для біодеградації

ПАР	ХПК, мг O ₂ /г	БПК ₅ , мг O ₂ /г	БПК ₅ /ХПК, %
біоПАР BS-4	188 ± 1.6	72 ± 2.2	38
біоПАР М-1	517 ± 2.3	228 ± 5.1	44

Обидві біоПАР є добрими субстратами для росту мікроорганізмів, в тому числі і для *B. megaterium* 1BD (Мал. 2). Встановлено, що BS-4 є джерелом азотного, фосфорного, калійного живлення і мікроелементів. М-1 містить в собі мікроелементи та вуглецеві сполуки, в тому числі сахарозу. Але перевага для використання в складі біопрепарату була віддана біоПАР мікробного походження BS-4, яка здатна до піноутворення, емульгування вуглеводнів та відмивання піску від нафти. Одною з головних причин такого вибору було те, що біоПАР з рослинної сировини М-1 містить в значній кількості джерело вуглецевого живлення, сахарозу, і отримується з м'яса, яка є продуктом харчової вартості.

Слідучим етапом розробки біопрепарату був підбір адсорбенту для мікробного компоненту та біоПАР. Під час біологічного очищення ґрунту мікробний компонент біопрепаратів вступає до конкуренції з природною мікрофлорою ґрунту. З метою утворення переважних умов для розвитку мікроорганізма-деструктора є можливим використовувати його попередню іммобілізацію на різних носіях. Необхідність в іммобілізації також обумовлена тим, що головні перетворення речовин в ґрунті проводяться адсорбованими та адгезованими клітинами. При використанні мікроорганізмів для очищення ґрунту практичний інтерес викликає метод адсорбційної іммобілізації, тому що його характеризує менша вартість та простота технології. При виборі можливого адсорбенту



Мал. 2. Ріст культури *V. megaterium* 1BD на середовищах з біоПАР: А - середовище з біоПАР М-1; 2, 3, 4 - концентрації М-1: 2,5, 5, 7,5 г/л; Б - середовище з біоПАР BS-4; 2, 3, 4, 5 - концентрації BS-4: 2, 2,5, 5, 10 г/л; 1 - ріст на мінеральному середовищі (контроль).

треба мати на увазі, що носій не повинен бути стороннім для ґрунтового середовища та екологічно безпечним. Ще одним важливим критерієм вибору є також вартість носія.

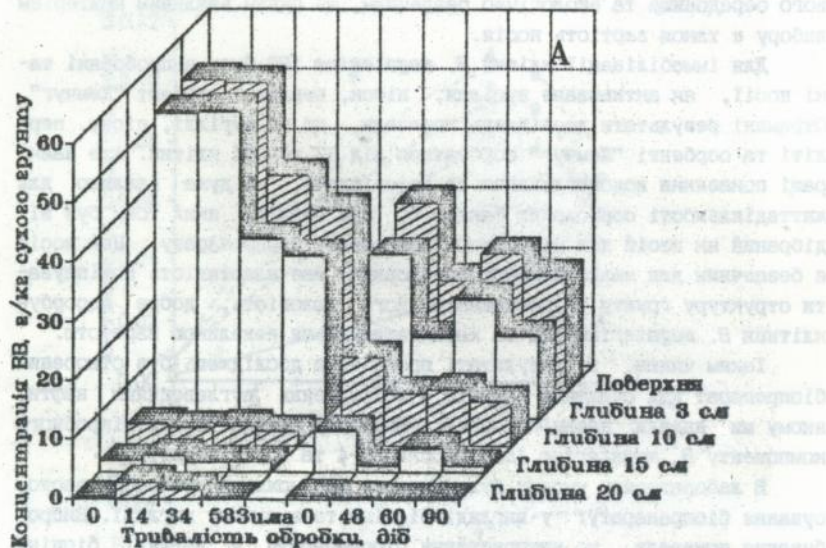
Для іммобілізації клітин *B. megaterium* 1BD були випробовані такі носії, як активоване вугілля, пісок, перліт і сорбент "Жемчуг". Отримані результати досліджень показали, що на вугіллі, піску, перліті та сорбенті "Жемчуг" сорбується від 67 до 98% клітин. Але найкращі показники водопоглинання та водовіддачі, що дуже важливо для життєдіяльності сорбованих бактерій, має перліт, який тому був відібраний як носій для мікробного компоненту біопрепарату. Цей носій є безпечним для навколишнього середовища, має властивість поліпшувати структуру ґрунту та регулювати його вологість, добре адсорбує клітини *B. megaterium* 1BD та характеризується невеликою вартістю.

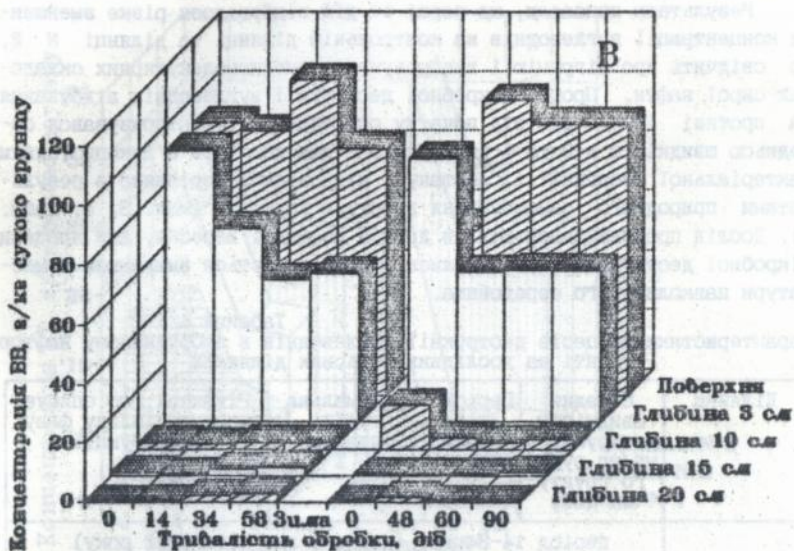
Таким чином, в результаті проведених досліджень був створений біопрепарат для очищення ґрунтів, забруднених вуглеводнями нафти, якому ми назвали назву "Лестан". Препарат складається з мікробного компоненту *B. megaterium* 1BD, біоПАР ES-4 та носія перліту.

В лабораторних умовах були вивчені два можливих способи застосування біопрепарату: у вигляді біопіни та в сухому вигляді. Випробування показали, що використання біопрепарату у вигляді біопіни дозволяє збільшити ступінь деструкції вуглеводнів нафти в 3.4 рази, порівняно з простим аромненням ґрунту бактеріальною суспензією. Застосування "Лестану" для обробки різних ґрунтів у вигляді пульпи дозволило досягнути ступені очищення 91-95% при середній швидкості деградації нафти - 69-72 мг/л за добу, що перевищує результати, отримані без використання біопрепарату.

Однак лабораторні дані недостатні для остаточної оцінки ефективності розробленого біопрепарату, тому що при попаданні до ґрунтових екосистем, мікроорганізми підпадають під вплив абіогенних та біогенних факторів, які неможливо повністю урахувати в лабораторних дослідках. У зв'язку з цим, ми провели річні польові дослідження біопрепарату "Лестан".

Польовий експеримент моделював аварійний розлив нафти. Через 3 дні після нафтового розливу була почата біологічна обробка ґрунту, яка відбувалася впродовж шести перших тижнів (один раз на тиждень), при цьому ділянка N 1 аромнувалася бактеріальною суспензією *B. megaterium* 1BD; на поверхню ділянки N 2 наносився біопрепарат "Лестан" в сухому вигляді та ділянка N 3 не оброблялась (контроль). Під





Мал. 3. Динаміка зміни кількості вуглеводнів в ґрунті дослідних ділянок: А - ділянка 1; В - ділянка 2; В - ділянка 3; BB - вуглеводні.

час очищення проводилось також періодичне підпушування ґрунту та поливання ділянок 1 і 2 з метою його аерування та підтримування вологості біля 15%.

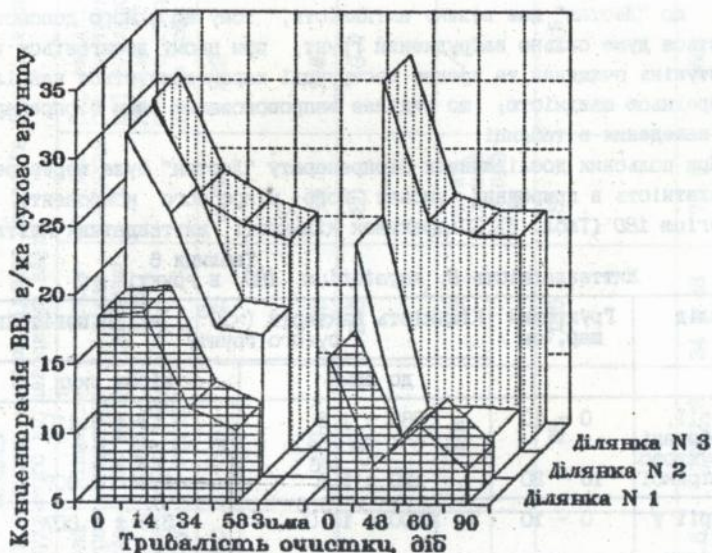
Результати показали, що перші 14 днів відбувалося різке зменшення концентрації вуглеводнів на контрольній ділянці та ділянці N 2, що свідчить про міграцію і випаровування низькомолекулярних складових сирої нафти. Процес мікробної деструкції вуглеводнів відбувався на протязі 14-34 днів від початку очищення та характеризувався середньою швидкістю в 3 та 4 рази більшою для дослідів в використанні бактеріальної суспензії і "Лестану", відповідно, порівняно з результатами природного самоочищення ґрунту в контролі (Мал. 3, 4; Табл. 4). Дослід продовжувався далі в другій половині вересня, але процеси мікробної деструкції сповільнились, що пояснюється зниженням температури навколишнього середовища.

Таблиця 4

Характеристики процесів деструкції вуглеводнів в забрудненому нафтою ґрунті на дослідних польових ділянках

Ділянка	Середня швидкість деструкції, мг/кг сухоґо ґрунту за добу	Період піврозпаду днів	Максимальна ступінь очищення, %	Рівняння, що описує експоненціальну фазу деструкції
період 14-34 дні (серпень-вересень 1992 року)				
Ділянка N1 (обробка бактер. суспензією)	351.1	30	35.1	$Y = \text{EXP}(-0.0233349 X) \times 26.1002$
Ділянка N2 (обробка "Лестаном")	416.3	32	47.5	$Y = \text{EXP}(-0.0216225 X) \times 33.2806$
Ділянка N3 (контроль)	105.9	146	30.2	$Y = \text{EXP}(-0.00474971 X) \times 24.9871$
період 0-48 днів (травень-червень 1993 року)				
Ділянка N1	162.8	48	57.2	$Y = \text{EXP}(-0.0144682 X) \times 15.6043$
Ділянка N2	290.2	33	73.3	$Y = \text{EXP}(-0.0210352 X) \times 21.9154$
Ділянка N3	214.1	86	29.0	$Y = \text{EXP}(-0.00810693 X) \times 31.8766$

Після зими був зміряний вміст вуглеводнів нафти в ґрунті дослідних ділянок. Результати показали, що всюди відбулося збільшення концентрації вуглеводнів, що пояснюється весняним підняттям капілярної води з нафтою. Далі на протязі 48 днів на всіх дослідних ділянках спостерігалось значне зниження концентрації вуглеводнів в



Мал. 4. Динаміка зміни середньої кількості вуглеводнів в ґрунтовому шарі 0-20 см: ВВ - вуглеводні.

ґрунті. На контрольній ділянці вміст вуглеводнів зменшився до значень, отриманих восени, при цьому ступінь очищення була 29%. На ділянці N 2 крім процесів міграції та випаровування компонентів нафти, відбувалася бактеріальна деструкція вуглеводнів, в результаті чого через 48 днів ступінь очищення ґрунту досягла 73.3%. Процеси біологічного очищення на ділянці N 1 відбувалися більш повільно та ступінь очищення через 48 днів була 57.2%.

Для періодів активної деструкції вуглеводнів нафти в забрудненому ґрунті були розраховані такі показники, як середня швидкість деструкції, період пірвопаду вуглеводнів та максимальна ступінь очищення (Табл. 4). Отримані результати показують, що ці показники були максимальними на ділянці, де використовувався біопрепарат "Лестан". Для остаточної оцінки ефективності практичного застосування

біопрепарату "Лестан", необхідно порівняти результати біочистоти нафтогазобруднених ґрунтів, отримані за допомогою відомих в світовій практиці біопрепаратів та при використанні "Лестану" (Табл. 5). Очевидно, що "Лестан" має велику активність, тому що з його допомогою очищується дуже сильно забруднений ґрунт, при цьому досягається висока ступінь очищення та процес деструкції характеризується найбільшою середньою швидкістю, що виділяє запропонований нами біопрепарат серед наведених в таблиці.

При польових дослідженнях біопрепарату "Лестан" була перевірена життєздатність в природних умовах його мікробного компоненту *B. megaterium 1B0* (Табл. 6). Підраунок кількості життєздатних клітин

Таблиця 6
Життєздатність *B. megaterium 1B0* в ґрунті

Дослід	ґрунтовий шар, см	Кількість бактерій ($\times 10^3$) в 1 г повітряно сухого ґрунту	
		до зими	після зими
Бактерії, адсорбовані на ґрунтовому матриці	0 - 10	280 \pm 1.8	13 \pm 0.110
	10 - 20	120 \pm 1.6	1.3 \pm 0.007
Бактерії у складі препарату "Лестан" в ґрунті	0 - 10	1100 \pm 15.0	5.5 \pm 0.007
	10 - 20	10 \pm 0.1	9.0 \pm 0.006

B. megaterium 1B0 до і після зимового періоду на дослідних ділянках показав, що кількість бактерій зменшилася після зими: на ділянці N1, де знаходилися несорбовані на носії бактерії, в шарах ґрунту 0-10 см та 10-20 см - в 22 і 92 рази, відповідно; на ділянці N2, де використовувалися адсорбовані на перліті бактерії, в шарі ґрунту 0-10 см - в 200 разів, але на глибині 10-20 см бактерії практично повністю вижили.

Таким чином, результатом проведених досліджень є створення біопрепарату "Лестан" для очищення ґрунту, забрудненого вуглеводнями нафти, який характеризується високою активністю, безпечний для навколишнього середовища та зберігає здатність до біочищення в мінливих ґрунтово-кліматичних умовах.

На основі проведених досліджень розроблені практичні рекомен-

Таблиця 5
Короткі відомості про практичне використання в польових умовах відомих способів біологічного очищення in-situ ґрунту забрудненого вуглеводнями нафти

Коротка характеристика способу очищення	Забруднювач	Глибина забруднення, см	Початкова концентрація вуглеводнів, мг/кг сухоґо ґрунту	Кінцева концентрація вуглеводнів, мг/кг сухоґо ґрунту	Тривалість очищення, днів	Ступінь очищення %	Сер. швидкість деструкції вуглеводнів, мг/кг сухоґо ґрунту за добу	Література
Біопрепарат Noggies NG20, розроблений фірмою Biodetox, застосований у вигляді біопіни	легкі мазути	20	8000-9000	700	35	91-92	223	Schüssler, 1986; Hein, 1986
- " -	мазут	20	5800	270	35	95	158	- " -
Біопрепарат з дріжджів роду <i>Candida</i> і суміші гребнів та вичавків винограду	сира нафта	10	200	40	248	80	0.7	A.c.1158258 A СССР
Бактерійна суспензія <i>Pseudomonas putida</i> NRRL-B-18117 і <i>Ps. putida</i> NRRL-B-18118	пентахлорфенол, диз. паливо, крезол, нафта	н/в*	н/в	н/в	42	ґрунт вільний від нафти	н/в	Пат. ЕПВ N 0270805
Біопрепарат, що складається з змішаної мікр. популяції, біоПАР, пожив. речовин, застосований у вигляді суспензії для очищення in situ	сира нафта	8	185	26	105	86	1.5	Ellis et al., 1990
Біопрепарат "Лестан"	сира нафта	20	29929.8	7917.8	34 + 48	73.3	268	

Н/в - не відомо.

дації по виробництву та впровадженню біопрепарату "Лестан". В додатку 1 наведені рекомендації по виготовленню "Лестану", які містять принципову технологічну схему отримання біопрепарату та опис стадій головних технологічних процесів (Мал. 5). Схема способів практичного застосування "Лестану" для біосочинення *in situ* нафтозабрудненого ґрунту демонструє 3 можливих варіанти, вибір яких залежить від характеру і від глибини забруднення та від розташування забрудненої області ґрунту по відношенню до ґрунтової води (Мал. 6).

"Лестан" був використаний для біосочинення ґрунту на ділянці аварії конденсатопроводу у заплаві річки Сула (село Лука Полтавської обл.); на території, забрудненій пічним паливом, в радгоспі "Троянда" Київської області; на береговій смугі та водній поверхні технічних ставків, забруднених нафтопродуктами, Гнединцівського заводу по переробці газу та стабілізації нафти.

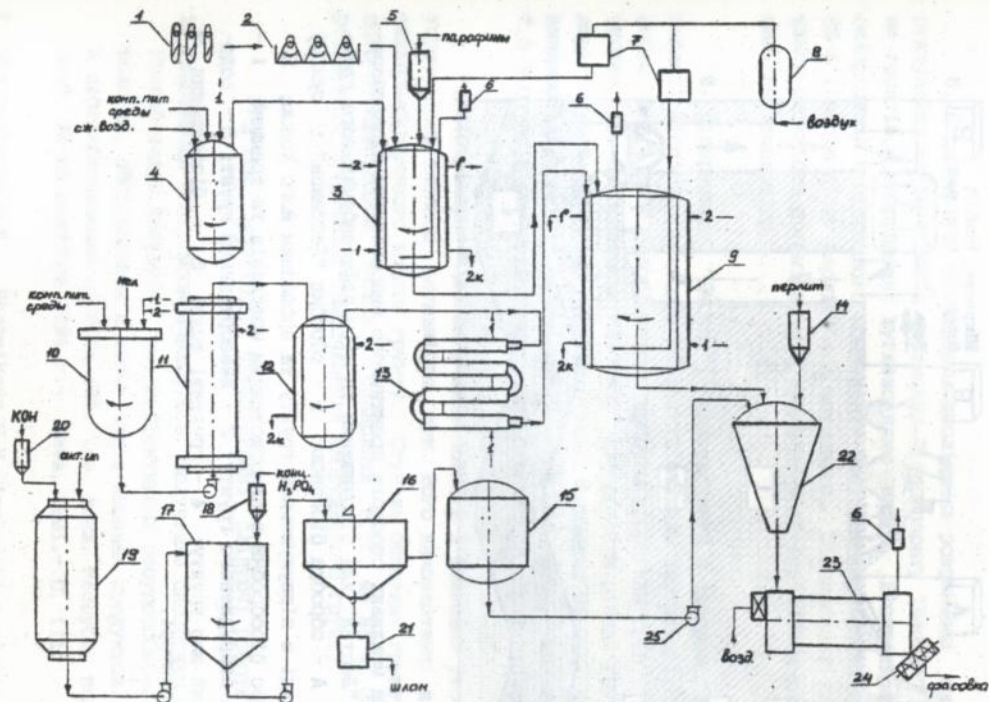
Висновки

1. Скринінг мікробного компоненту препарату для біологічного очищення забруднених нафтою ґрунтів показав, що штам *B. megaterium* 1BD є активним деструктором вуглеводнів нафти, типовим мешканцем ґрунту, непатогенним та спроможним утилізувати широкий спектр вуглеводнів, включаючи *n*-парафіни, ароматичні та поліциклічні ароматичні вуглеводні.

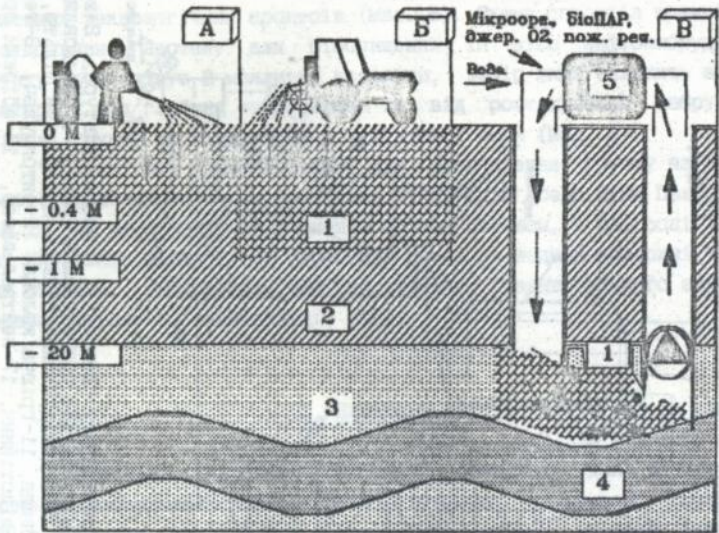
2. Ефективним носієм мікробного компоненту біопрепарату є пісок перлітовий спучений, який добре адсорбує *Bacillus megaterium* 1BD, покращує структуру ґрунту та регулює його вологість, нешкідливий для навколишнього середовища.

3. Розроблені нові екологічно нешкідливі біоПАР BS-4 та M-1, придатні для використання в біологічному очищенні нафтозабруднених ґрунтів. Оптимальні умови проведення лужного гідролізу мікробної біомаси з метов отримання піноутворюючого біоПАР BS-4: температура 21-28°C, тривалість - 20 годин, концентрація КОН 5-7%.

4. БіоПАР BS-4 та M-1 здатні знижувати поверхневий натяг, є піноутворювачами, належать до біологічно м'яких ПАР. БіоПАР BS-4 ка-



Мал. 5. Принципова технологічна схема отримання біопрепарату "Лестан": 1-чиста культура, 2-вегетативний посівний матеріал в колбах, 3-посівний апарат, 4-змішувач для приготування поживного середовища, 5-збірник n-парафінів, 6-фільтр відпрацьованого повітря, 7-індивідуальний фільтр, 8-головний фільтр, 9-ферментер, 10-змішувач для приготування поживного середовища, 11-ґріюча колона, 12-витримувач, 13-теплообмінник, 14-збірник перліту, 15-збірник нейтралізату, 16-відстійник, 17-нейтралізатор, 18-збірник ортофосфорної кислоти, 19-гідроліз-апарат, 20-збірник луку, 21-збірник шламу, 22-змішувач, 23-сушарка барабанна, 24-шнек для вивантаження сухого продукту, 25-насос.



Мал. 6. Схема можливих способів практичного використання біопрепарату "Лестан" для біоочищення *in situ* нафтозабрудненого ґрунту: А - обробка біопеною; Б - обробка "Лестаном" в сухому вигляді з піддуванням ґрунту та зрошенням його водою; В - процес біообробки з використанням колодязів та траншей; 1 - зона забрудненого ґрунту; 2 - незабруднений ґрунт; 3 - водонесний шар ґрунту; 4 - ґрунтові води; 5 - біоочищення в біореакторі.

рактирується також здатністю до емульгування вуглеводнів і відмивання піску від нафти. Обидві біоПАР є добрими субстратами для росту мікроорганізмів-деструкторів нафтових забруднень.

5. В результаті проведених досліджень розроблені наукове обґрунтування та технологія отримання біопрепарату "Лестан" для очищення ґрунтів, забруднених вуглеводнями нафти. Біопрепарат "Лестан" складається з мікробного компоненту *Bacillus megaterium* 18D, біоПАР BS-4 і носіїв піску перлітового опученого. Біопрепарат характеризується стійкістю до зміни умов навколишнього середовища та до екстремальних температур.

6. Біопрепарат "Лестан", використаний в лабораторних умовах у вигляді біопіни, дозволяє збільшити ступінь деструкції вуглеводнів нафти в 3.4 рази, порівняно з простим зрошенням ґрунту бактерійною суспензією. Використання "Лестану" для обробки ріаних ґрунтів у вигляді пульпи дозволяє досягти ступені очищення 91-95% при середній швидкості деградації нафти 69-72 мг/л за добу, що перевищує в 7.5-8.0 разів результати, отримані без використання біопрепарату.

7. Біопрепарат "Лестан", застосований в польових умовах, характеризується високою активністю при його використанні для очищення сильнозабрудненого нафтою ґрунту. Ступінь очищення ґрунту, обробленого біопрепаратом "Лестан", становить 73.3%, що на 44.3% перевищує результати природного самочищення забрудненого ґрунту.

На тему дисертації опубліковані наступні роботи :

1. Стабникова Е.В., Московченко М.В. Получение биологических ПАВ // Разработка и внедрение высокоэффективных ресурсосберегающих технологий, оборудования и новых видов пищевых продуктов в пищевой и перерабатывающей отрасли АПК: Тез. докл. Республ. научно-тех. конф. 24-26 сентября 1991 г.- Киев, 1991.- С. 111.
2. Moscovchenko M.V., Stabnikova H.V. Application of biosurfactants to bioremediation of contaminated soil // Soil decontamination

using biological processes: Preprints of International Symposium 6-9 December 1992.- Karlsruhe/Germany, 1992.- P. 359-365.

3. Московченко М.В., Стабникова Е.В., Иванов В.Н., Панежда И.А. Использование биогенных поверхностно-активных веществ в микробиологической очистке почвы от углеводов нефти // Микроб. журн.- 1993.- 55, №1.- С. 75-78.
4. Московченко М.В., Стабникова Е.В., Иванов В.Н. Оптимизация процесса гидролиза микробной биомассы с целью получения биогенного пенообразующего вещества // Пищевая промышленность.- 1994.- в печати.
5. Московченко М.В., Стабникова Е.В., Москаленко Н.В. Химический состав поверхностно-активных веществ // Микробиол. журн.- 1994.- в печати.
6. Стабникова Е.В., Селезнева М.В., Дульгеров А.Н. Скрининг микробного компонента препарата для очистки нефтезагрязненных почв // Тез. докл. 18'аду Укр. мікробіол. товариства 13-18 вересня 1993 р. / Микробиол. журн.- 1994.- в печати.



Підписано до друку 19.04.94р формат 60x84/16
Папір друк. Умов. друк. л. 1,0. Тираж 100 примірник. Заказ №692
Надруковано ЦУОП ДНПП "Плодзинконсерв" м. Київ , Саксаганського , 1

157481

AB 30.012

AB 30.012