

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**Факультет захисту рослин, біотехнології та екології**

**ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**

Завідувач кафедри фізіології, біохімії  
рослин та біоенергетики

\_\_\_\_\_ Світлана ПРИЛУЦЬКА

(підпис)

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 р.

**БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

на тему «Мікроорганізми-деструктори нафтових відходів»

Спеціальність: 162 «Біотехнології та біоінженерія»

**Гарант освітньої програми**

Кандидат біологічних наук,  
доцент кафедри екобіотехнології  
та біорізноманіття

\_\_\_\_\_

(підпис)

Олена КВАСКО

**Керівник бакалаврської кваліфікаційної  
роботи**

Кандидат сільськогосподарських  
наук, доцент кафедри фізіології,  
біохімії рослин та біоенергетики

\_\_\_\_\_

(підпис)

Наталія НЕСТЕРОВА

**Виконала**

\_\_\_\_\_

(підпис)

Аліна НАГОРНА

**КИЇВ-2025**

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології  
Кафедра фізіології, біохімії рослин та біоенергетики  
Освітній ступінь «Бакалавр»  
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»**

**ЗАТВЕРДЖУЮ**  
Завідувач кафедри  
фізіології, біохімії рослин та біоенергетики  
Світлана ПРИЛУЦЬКА  
“ ” \_\_\_\_\_ 2025 р.

**ЗАВДАННЯ**  
**на виконання бакалаврської кваліфікаційної роботи студентці**

Нагорній Аліні Артемівні

1. Тема роботи Мікроорганізми-деструктори нафтових відходів  
керівник роботи к.с.-г.н., доцент Нестерова Наталія Георгіївна
2. Строк подання студенткою роботи 20 травня 2025 року
3. Вихідні дані до роботи: приблизний список наукових праць відповідно до теми, перелік методик для виділення та ідентифікації мікроорганізмів, склад поживних середовищ для культивування мікроорганізмів, список підходів для оцінки здатності ізолятів до деструкції вуглеводнів.
4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): виділення мікроорганізмів з ґрунту; підбір поживного середовища для культивування ізолятів; проведення ідентифікації мікроорганізмів за морфолого-культуральними ознаками, біохімічними тестами; визначення ефективності біодеградації вуглеводнів мікроорганізмами.
5. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1	к.с.-г.н., доцент Нестерова Н.Г.; к.б.н., с.н.с. Левішко А.С.	03.09.2024	03.09.2024
2	к.с.-г.н., доцент Нестерова Н.Г.; к.б.н., с.н.с. Левішко А.С.	26.11.2024	26.11.2024
3	к.с.-г.н., доцент Нестерова Н.Г.; к.б.н., с.н.с. Левішко А.С.	08.02.2025	08.02.2025

6. Дата видачі завдання 1 вересня 2024 року

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Написання огляду літератури відповідно до обраної теми	Вересень- листопад	
2	Підбір матеріалів та методів	Листопад- лютий	
3	Здійснення лабораторних досліджень та аналіз результатів	Лютий- квітень	
4	Висновки та оформлення роботи	Квітень- травень	

Завдання прийняла до виконання

\_\_\_\_\_

( підпис )

**Нагорна А.А.**

Керівник  
кваліфікаційної роботи

\_\_\_\_\_

( підпис )

**Нестерова Н.Г.**

Співкерівник в установі

\_\_\_\_\_

( підпис )

**Левішко А.С.**

## РЕФЕРАТ

Робота виконана на 55 сторінках та включає перелік умовних позначень, вступ, три розділи, висновки, список використаних джерел та додатки. До того ж, вона складається з 18 рисунків і 4 таблиць.

**Мета дослідження** – оцінка ефективності деструкції вуглеводнів мікроорганізмами.

### **Завдання дослідження:**

- Провести огляд літературних джерел на основі якого визначити джерела нафтового забруднення, хімічний склад нафти, групи мікроорганізмів, що приймають участь в біодеградації нафти та шляхи розщеплення вуглеводнів, вплив факторів середовища на процес, а також проблеми та перспективи використання підходу.
- Виділити мікроорганізми з ґрунту, підібрати поживне середовище та встановити оптимальні умови культивування.
- Провести ідентифікацію ізолятів на основі морфолого-культуральних ознак, даних, одержаних в ході мікроскопії, фарбування за Грамом та біохімічних тестів.
- Визначити ефективність біодеградації вуглеводнів мікроорганізмами.

**Об'єкт дослідження** – мікроорганізми-деструктори нафтових відходів.

**Предмет дослідження** – процес деструкції вуглеводнів мікроорганізмами.

### *Результати дослідження:*

- Встановлено причини нафтового забруднення, кількісний вміст компонентів, що входять до складу нафти, види мікроорганізмів, які використовують в біоремедіації, ферментативні шляхи деструкції вуглеводнів, вплив умов середовища на процес, проблеми та перспективи залучення мікроорганізмів до ліквідації нафтових розливів.

- Виділено мікроорганізми з ґрунту, визначено, що вони ростуть на поживному середовищі з додаванням нафти та дизельного палива як джерел вуглецю, а на середовищі, що доповнене бензином А-95 колонії не утворюються. Виявлено, що оптимальними умовами є температура 25 °С та рН 7,0.
- Встановлено, що виділені бактерії належать до роду *Pseudomonas*, тому що вони паличкоподібні, грамнегативні, демонструють каталазну, оксидазну активність, здатність утилізувати цитрат, виявляють негативний результат при проведенні тесту на індол та реакції Фогеса-Проскауера.
- Визначено, що виділені мікроміцети належать до роду *Aspergillus*, оскільки їх колонії відзначаються темними краями, конідіальна голівка має чорний колір, гриби зброджують лактозу та мальтозу, але не розкладають сахарозу.
- Виявлено, що ефективність біодеградації нафти ізолятами роду *Pseudomonas* становила 16,8%, мікроміцетами роду *Aspergillus* складала 13,7%, а змішаною культурою мікроорганізмів – 20,6%.
- Встановлено, що ефективність деструкції дизельного палива бактеріями роду *Pseudomonas* становила 19,8%, грибовими агентами роду *Aspergillus* складала 12,7%, а змішаною культурою мікроорганізмів – 21,4%.

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....</b>	<b>9</b>
<b>ВСТУП.....</b>	<b>10</b>
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>12</b>
1.1. Джерела нафтового забруднення, хімічний склад нафти, її вплив на довкілля та здоров'я людини .....	12
1.2. Мікроорганізми-деструктори нафти та механізм їх дії.....	16
1.2.1. Біоремедіація в ролі методу очищення забруднених нафтою територій.....	16
1.2.2. Основні групи мікроорганізмів-деструкторів нафти та нафтових відходів .....	18
1.2.3. Ферментативні механізми розкладання нафти.....	20
1.3. Вплив факторів середовища на ефективність біодеградації нафти .....	23
1.3.1. Влив фізико-хімічних параметрів на активність мікроорганізмів .	23
1.3.2. Стимуляція деструкції нафти мікроорганізмами .....	25
1.4. Проблеми та перспективи .....	27
1.4.1. Основні проблеми застосування мікроорганізмів у біоремедіації....	27
1.4.2. Перспективи використання методів біодеструкції нафти .....	29
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....</b>	<b>31</b>
2.1. Підбір середовища для культивування мікроорганізмів-деструкторів...	31
2.1.1. Проаналізовані середовища .....	31
2.1.2. Оптимізоване середовище для культивування ізолятів.....	32
2.2. Метод серійних десятикратних розведень .....	34
2.2.1. Відбір проб ґрунту та підготовка зразків .....	34
2.2.2. Приготування ґрунтової суспензії.....	35
2.2.3. Посів мікроорганізмів .....	36
2.3. Ідентифікація мікроорганізмів.....	37
2.3.1. Мікроскопія.....	37
2.3.2. Фарбування за Грамом .....	39
2.3.3. Біохімічні тести .....	40

2.4. Ефективність біодеградації.....	41
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....</b>	<b>43</b>
3.1. Колонії мікроорганізмів .....	43
3.2. Ідентифікація ізолятів.....	45
3.3. Визначення ефективності біодеградації вуглеводнів.....	47
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>51</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>52</b>
<b>ДОДАТКИ.....</b>	<b>56</b>

## **ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ**

API – Американський інститут нафти

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

КоА – кофермент А

МПБ – м'ясо-пептонний бульйон

НААН – Національна академія аграрних наук

ПАВ – поліциклічні ароматичні вуглеводні

ПАР – поверхнево-активні речовини

## ВСТУП

Розливи нафти порушують сталість екосистем внаслідок виникнення необоротних змін у водному та ґрунтовому середовищі. Негативний вплив вуглеводнів розповсюджується на рослинні організми, гідробіонтів, тварин, що мешкають на суходолі. До того ж, компоненти нафти сприяють появі хронічних захворювань та гострих порушень у людей, а існуючі фізико-хімічні методи ліквідації забруднення є актуальними лише в контексті усунення первинної проблеми.

Використання мікроорганізмів для ліквідації нафтових розливів є перспективним підходом з огляду на екологічність та ефективність очищення біоценозів. Метод передбачає зниження антропогенного навантаження на довкілля внаслідок скорочення застосування хімічних засобів та техногенних прийомів порівняно зі стандартними шляхами очищення забруднених вуглеводнями територій. Залучення ферментативних систем мікроорганізмів для розщеплення сполук нафтової фракції відкриває шлях для перетворення останніх на безпечні метаболіти та відновлення екологічної рівноваги.

**Мета дослідження** – оцінка ефективності деструкції вуглеводнів мікроорганізмами.

### **Завдання дослідження:**

- Провести огляд літературних джерел на основі якого визначити джерела нафтового забруднення, хімічний склад нафти, групи мікроорганізмів, що приймають участь в біодеградації нафти та шляхи розщеплення вуглеводнів, вплив факторів середовища на процес, а також проблеми та перспективи використання підходу.
- Виділити мікроорганізми з ґрунту, підібрати поживне середовище та встановити оптимальні умови культивування ізолятів.
- Провести ідентифікацію ізолятів на основі морфолого-культуральних ознак, даних, одержаних в ході мікроскопії, фарбування за Грамом та біохімічних тестів.

- Визначити ефективність біодеградації вуглеводнів мікроорганізмами за допомогою гравіметрії.

**Об'єкт дослідження** – мікроорганізми-деструктори нафтових відходів.

**Предмет дослідження** – процес деструкції вуглеводнів мікроорганізмами.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Джерела нафтового забруднення, хімічний склад нафти, її вплив на довкілля та здоров'я людини

Нафта – масляниста речовина природного походження, що має специфічний запах та для якої властиве горіння. До її складу входять вуглеводні, азот, кисень, сірка та метали.

Хоча велика кількість осіб думає, що розливи нафти виникають внаслідок антропогенної діяльності, низка випадків вказує на природні причини нафтового забруднення. На дні водойм є ймовірність просочування вуглеводнів через тріщини в земній корі. З глибин морів та океанів сполуки нафтової фракції потрапляють на поверхню та формують плівку. Однією з ключових причин подібного роду витоків речовин є землетруси.

Вулканічна активність також зумовлює нафтові розливи. Виверження вулканів, які розповсюджені на суходолі, є причиною формування смолянистих кульок, що являють собою шматки нафти у твердому стані. Одними з найнебезпечніших є підводні вулкани, які спричиняють витік вуглеводнів та поширення сполук у великих за площею водних джерелах.

Аномальні погодні умови до яких слід віднести цунамі, шторм, урагани викликають пошкодження інфраструктури, що задіяна в процесах зберігання, видобування нафти. До того ж, екстремальні явища завдають шкоду транспорту, який приймає участь в перевезенні вуглеводнів [1].

Інша частина інцидентів пов'язана з виникненням нафтового забруднення через людську діяльність. Наприклад, деякі особи можуть зливати похідні нафтової фракції (дизельне паливо, бензин) в каналізацію при заміні наведених складових. Варто зазначити, що певні компанії не хочуть витратити власні ресурси на процес переробки відходів, тому вуглеводні потрапляють до озер, річок, чи більших водоносних горизонтів (моря, океани). В разі неналежної

утилізації сполуки опиняються у підземних водах, ґрунтовому середовищі та акумулюються в живих організмах.

Опосередковане забруднення включає виділення летких вуглеводнів внаслідок спалювання нафтопродуктів. Окремі компоненти (приклад – ПАВ та бензол) несуть доволі серйозу загрозу не лише для людей, а й для екосистеми загалом [2,3].

Таким чином, антропогенна діяльність спричиняє значну частину нафтових розливів, недостатня увага зі сторони відповідальних осіб слугує підставою для появи витоків сполук нафтової фракції. Не зважаючи на це, природні процеси також займають певний відсоток від всебічного забруднення.

Таблиця 1.1

#### Елементний склад нафти [4].

Назва елемента	Масова частка (%)
Вуглець (C)	83-87
Водень (H)	10-14
Сірка (S)	0,05-6
Азот (N)	0,1-2
Кисень (O)	0,05-1,5
Метали	<0,1

Таблиця 1.2

#### Вуглеводневий склад нафти [4].

Тип вуглеводню	Вміст у нафті (%)
Алкани (парафіни)	30-60
Циклоалкани (нафтени)	49-60
Ароматичні вуглеводні	15-30
Асфальтенові сполуки	6

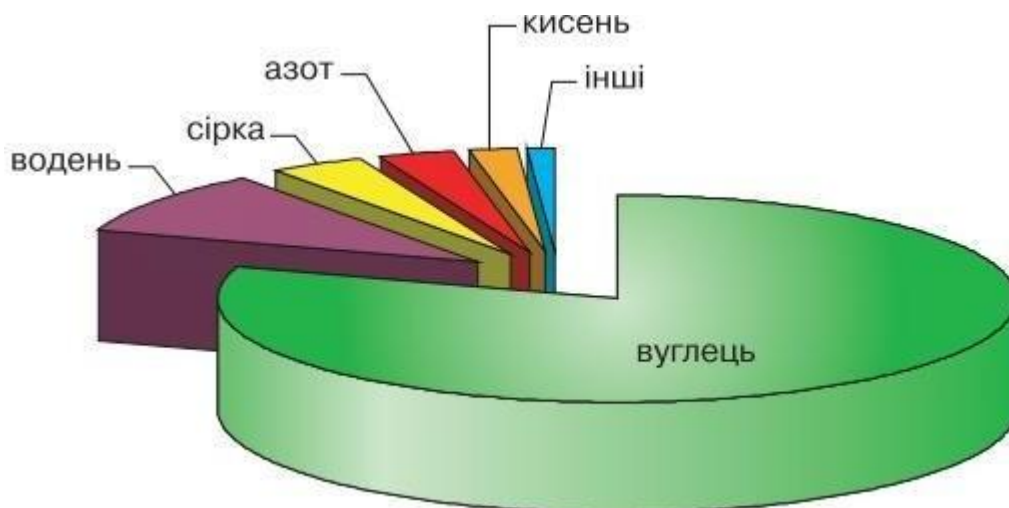


Рис. 1.1. Елементний склад нафти [5].

До складу сирової нафти входять металоорганічні речовини та неорганічні солі, як вуглеводні, так і неуглеводневі сполуки. Необхідно зауважити, що алкіни та алкени зазвичай відсутні через нездатність їх утворення у відновній атмосфері.

Сірка в нафті існує у формі сіркоорганічних сполук, які поділяють на 2 групи: кислотні та некислотні. До кислотних належать меркаптани (тіоли), тоді як некислотні – це сульфіді, дисульфіді та тіофен. Сірководень є найважливішим компонентом, проте від здатний викликати корозію.

Сполуки азоту наявні або у доволі простій гетероциклічній формі (приклади – пірол і піридин) або мають більш складну структуру, як-от порфірин. Не зважаючи на те, що згідно з таблицею вміст азоту становить 0,1-0,2%, до важких нафтових фракцій входить 0,9% даного елемента. Порівняно з сірчаними сполуками, азотисті відзначаються вищою термостабільністю.

Кисневмісні сполуки складноструктуровані, на відміну від сірковмісних. До того ж, вони не є перешкодою для подальших процесів обробки та утилізації. Слабокислі сполуки є основними серед класу кисневмісних. До них потрібно віднести феноли, карбонові кислоти, нафтенову та крезилісову кислоти. Нафтенові сполуки вважаються похідними циклопентану та циклогексану, а їх бічний ланцюг карбоксиалкільний.

Найрозповсюдженішими металічними елементами в складі нафти є магній, натрій, алюміній, ванадій, залізо та нікель. Вони формують неорганічні солі (хлориди магнію та натрію) та металоорганічні сполуки (порфірини, що включають ванадій і нікель).

Залежно від відсоткового вмісту класів вуглеводнів сиру нафту поділяють та три типи:

- В складі парафінової нафти переважають алкани. Їх частка більша, ніж частка циклоалканів, ароматичних вуглеводнів.
- Порівняно з парафіновим типом, нафтенова нафта характеризується домінуючою кількістю ароматичних вуглеводнів та циклоалканів. В свою чергу, вміст алканів не такий значний.
- Асфальтово-смолиста нафта складається з великого числа ПАВ та асфальтенів. Знову ж таки, алканів менше, ніж в парафіновій нафті.

Інша класифікація нафти включає поділ на 6 груп ґрунтуючись на величині градусу API. Суперлегка нафта має щільність до  $0,78 \text{ г/см}^3$  (градус API вище 50). Надлегка нафта відзначається щільністю  $0,78\text{-}0,82 \text{ г/см}^3$  (градус API 41,1-50). Легка нафта характеризується щільністю  $0,82\text{-}0,87 \text{ г/см}^3$  (градус API 31,1-41,1). Щільність середньої нафти знаходиться в межах  $0,87\text{-}0,92 \text{ г/см}^3$  (градус API 22,3-31,1). Значення щільності важкої нафти –  $0,92\text{-}1 \text{ г/см}^3$  (градус API 10-22,3). Надважка нафта має щільність вище  $1 \text{ г/см}^3$  (градус API до 10).

Вміст солі виражають у мг NaCl/1 л нафти. Якщо одержане значення складає 10 фунтів/1000 барелей та вище, то необхідно провести видалення компоненту через ймовірність виникнення корозії. Частка сірки обумовлює поділ нафти на солодку (0,1-0,5%), напівсолодку (0,5-0,8%) та кислу (0,8-5%). Іноді в золі, що залишається після згорання нафти, виокремлюють число металічних солей. До того ж, визначають температуру застигання, яка корелюється з вмістом нафтового воску. Парафінова нафта має в своєму складі більшу його кількість, ніж інші типи [4].

Забруднення навколишнього середовища нафтою є причиною появи необоротних порушень водних екосистем та біоценозів суходолу. Внаслідок нафтових розливів найбільше страждають моря, океани та інші джерела.

Під час розливу нафти в морях та океанах утворюється гідрофобна плівка, яка перешкоджає газообміну та спричиняє дефіцит кисню з подальшим переважанням анаеробних процесів. Через недостатню кількість  $O_2$  гинуть водні організми. Окрім того, окиснення нафтових фракцій слугує причиною появи токсичних сполук, а емульгування призводить до низької можливості видалення вуглеводнів. Адсорбція важких фракцій зумовлює осадження сполук на дні водойми та тривале забруднення

Організми не отримують достатню кількість світла для проведення процесу фотосинтезу, тому відбувається порушення стандартного трофічного ланцюга. Токсичні компоненти здатні накопичуватись всередині морських організмів та внаслідок передачі по трофічному ланцюгу акумулюватись в цілих популяціях гідробіонтів.

У людей нафтові вуглеводні та інші компоненти, що входять до її складу спричиняють ураження дихальних шляхів у випадку випаровування. Наслідком прямого контакту є ураження шкіри різного роду, а вживання морепродуктів, які зазнали впливу токсичних сполук, є причиною гострих порушень шлунково-кишкового тракту. Хронічні ефекти включають онкологічні хвороби, акумуляцію важких металів та неврологічні розлади [6].

## **1.2. Мікроорганізми-деструктори нафти та механізм їх дії**

### ***1.2.1. Біоремедіація в ролі методу очищення забруднених нафтою територій***

Біоремедіація є екологічно чистою та економічно доцільною технологією порівняно зі стандартними фізико-хімічними методиками ліквідації нафтових забруднень (очистка та відкачка вуглеводнів, барботування, вилучення парів з

грунтового середовища, термічна десорбція та хімічне окислення). Біоремедіація передбачає використання мікроорганізмів, чи інших біологічних агентів з метою деструкції шкідливих речовин, їх видалення з ґрунту, чи водних джерел. Біоремедіацію здійснюють як «*in situ*», так і «*ex situ*». Другий з наведених підходів залучають в разі несприятливої для існування мікроорганізмів температури, високої щільності покриву, оскільки в такому разі розподіл поживних речовин буде неефективним [7].

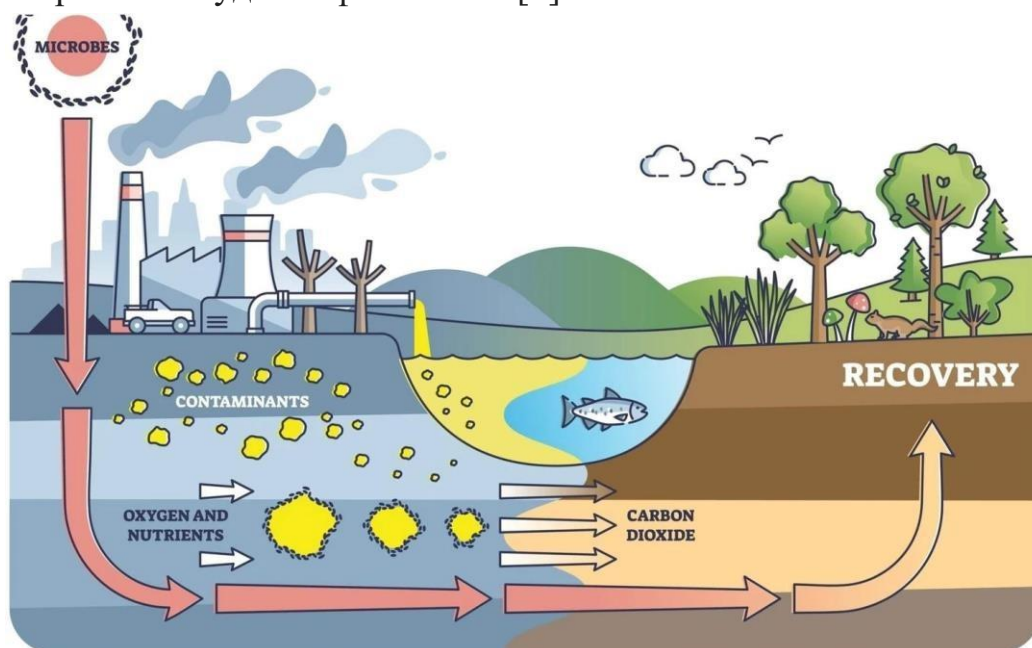


Рис. 1.2. Схема біоремедіації [7].

В основу біостимуляції покладено необхідність зміни зовнішніх умов для підвищення активності бактерій, мікроміцетів. Основними шляхами виступають внесення макро- та мікроелементів, акцепторів електронів. Частіше за все ґрунт підживлюють азотом, фосфором, воднем та кисневмісними сполуками (наприклад – у вигляді патоки). При перебігу анаеробних процесів розкладання актуальним є додавання донорів електронів, щоб консорціуми мікроорганізмів застосовували галогеновані сполуки як кінцеві акцептори. Також не слід забувати про важливість підтримання ґрунту в дренажному стані, регулювання вмісту вологи до оптимального значення [8].

Біоаугментацію здійснюють за допомогою вилучення мікроорганізмів із забрудненої ділянки та їх переміщення на територію, що підлягає очищенню.

Спираючись на те, що автохтонні види за короткий проміжок часу від дати забруднення ще не можуть достатньо ефективно розщеплювати токсиканти, вносять екзогенні штами, які тривалий час перебували в техногенному середовищі. Якщо в разі застосування біостимуляції потрібно підвищити швидкість та результативність біодеградації за допомогою внесення поживних речовин, то біоаугментація передбачає внесення консорціумів, що здатні до складних метаболічних перетворень [9].

Оскільки шкідливі речовини, в тому числі й сполуки нафтової фракції здатні акумулюватись в організмі, фіторе mediaція є методом залучення вищих рослин до процесу очищення ґрунту, води та повітря. Не зважаючи на переваги, даний підхід зумовлює видалення забруднювачів лише з верхнього шару ґрунту, підвищує його родючість. До того ж, високий вміст важких металів є згубним для багатьох рослин. Через накопичення токсикантів у тканинах потрібно чітко дотримуватись заходів з утилізації [10].

Отже, біоремедіація є відносно дешевим та екологічним методом очищення забруднених територій. Обмеження включають залежність від навколишніх умов, необхідність контролювати параметри середовища, підтримувати життєздатність місцевих консорціумів, чи екзогенних мікроорганізмів, висаджених рослин.

### **1.2.2. Основні групи мікроорганізмів-деструкторів нафти та нафтових відходів**

Одні вуглеводні в складі нафти більш легко піддаються деструкції, в той час як для розщеплення інших потрібно залучати мікроорганізми, що застосовують специфічні ферментативні системи для перетворення токсикантів на безпечні метаболіти. Найважче розкладаються ПАВ.

Вчені довели, що *Mycobacterium spp.*, *Sphingomonas spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Burkholderia spp.*, *Arthrobacter spp.* здатні розщеплювати алкілароматичні сполуки у морських джерелах. В свою чергу, науковці

повідомили про можливість *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter lwoffii*, *Micrococcus roseus*, *Flavobacterium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Bacillus spp.*, в тому числі *Bacillus subtilis* розкласти нафту в прісноводних водоймах.

Варто зазначити, що ефективність біодеградації вуглеводнів мікроміцетами складає 6-82%, а бактеріальними агентами, що мешкають в ґрунті – 0,13-50%. Найкраще розщеплюють сполуки нафтової фракції морські бактерії. Дієвість їх використання становить 0,003-100%. З метою досягнення кращого результату створюють штучні консорціуми на основі мікроорганізмів, що виділені з різних екологічних ніш.

Згідно з експериментальними даними, представники роду *Acinetobacter* застосовують алкани, довжина ланцюгів яких варіюється в межах 10-40 карбонів, як єдине джерело вуглецю. *Sphingomonas spp.* вважається деструктором поліароматичних вуглеводнів. *Burkholderia spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Mycobacterium spp.*, *Gordonia spp.*, *Aeromicrobium spp.*, *Dietzia spp.* є потенційними мікроорганізмами, які доцільно використовувати для ліквідації нафтових забруднень [11,12].

Відповідно до досліджень, грибні агенти родів *Neosartorya*, *Graphium*, *Amorphoteca*, *Talaromyces* та дріжджі *Pichia spp.*, *Candida spp.*, *Yarrowia spp.* здатні розкласти вуглеводні. У водоймах нафту розщеплюють *Trichosporon mucoides*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Geotrichum spp.*, тоді як на суходолі *Pencillium spp.*, *Aspergillus spp.* та *Cephalosporium spp.* виявляють здібності до деструкції токсикантів.

Найпростіші та водорості є маловивченими мікроорганізмами в галузі ліквідації нафтових розливів. Не зважаючи на це, існують дані, що водорість *Prototheca zopfii* розкладає ароматичні вуглеводні, алкани та ізоалкани. Деякі види зелених, бурих, червоних та діатомових водоростей можуть окислювати нафталін [12,13].

Таким чином, бактерії та гриби є найбільш вивченими мікроорганізмами-деструкторами. Ефективність біодеградації вуглеводнів першими в певних

випадках сягає 100%. На противагу, дані щодо розщеплення сполук нафтової фракції найпростішими відсутні, а водорості, які окислюють вуглеводні є малодослідженими.

### *1.2.3. Ферментативні механізми розкладання нафти*

Ферментні системи мікроорганізмів забезпечують розкладання вуглеводнів у широкому діапазоні температур, рН, засоленості, а також як в аеробних, так і в анаеробних умовах. Розщеплення сполук, що містяться в нафті, відбувається поетапно із залученням різноманітних вторинних метаболітів бактерій, мікроміцетів та водоростей. Гени, які відповідають за деструкцію токсикантів, локалізуються в хромосомній та позахромосомній (плазмідній) ДНК.

Аеробна біодеградація передбачає залучення оксигеназ. В свою чергу, під час процесу монооксигенази вводять 1 атом кисню в сполуку, а діоксигенази – 2. В ході анаеробної біодеградації ключова роль належить сульфатредуючим бактеріям, що застосовують різноманітні кінцеві акцептори електронів.

Аеробний процес є швидшим, оскільки акцептором є  $O_2$ . При окисненні насичених вуглеводнів аліфатичного ряду кінцевим продуктом виступає ацетил-КоА. Сполука катаболізується в циклі лимонної кислоти. До того ж, ланцюг переносу електронів постійно повторюється, що з часом призводить до розщеплення навіть складних вуглеводнів. Ароматичні вуглеводні (нафталін, бензол, ксилол, толуол) піддаються аеробній деградації, проте в ході деструкції проміжною сполукою є катехол, чи подібні йому. Надалі фіксується введення катехолу до циклу лимонної кислоти та перетворення метаболіту на  $CO_2$ .

Алкангідроксилази являють собою ферменти, які розщеплюють алкани. Вчені умовно поділяють ферменти, що відповідають за розкладання алканів на три групи. Перший клас спричиняє деструкцію алканів, які містять 1-4 карбони в ланцюзі. В окисненні приймають участь ферменти, подібні до метанмонооксигенази. Другий підтип обумовлює деградацію алканів, ланцюг

яких включає 5-16 карбонів. Окислення відбувається внаслідок залучення цитохромних, чи негемових ферментів P450. Якщо ж ланцюг включає 17 карбонів, то сполука важко піддається розщепленню, а ферменти, які активізують процес лишаються не встановленими.

Деякі мікроорганізми продукують одразу кілька типів алкангідроксилаз, тому вони виявляють здатність до деструкції алканів, довжина вуглецевого ланцюга яких варіюється. Найвивченіший шлях розкладання алканів включає використання плазмиди *OCT* бактерії *Pseudomonas putida Gpo1*. Механізм передбачає перетворення алканів на спирти. В процесі приймає участь мембранна монооксигеназа, рубредоксинредуктаза та рубредоксин [14].

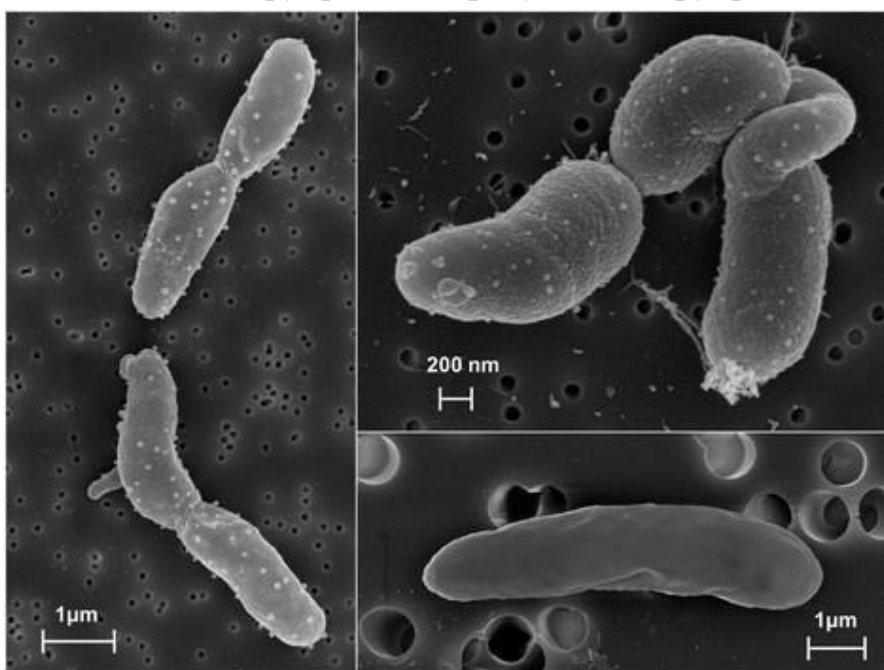


Рис. 1.3. Скануючі електронні мікрофотографії *Pseudomonas putida*. Клітини, одержані з рідкої культури [15].

Бактеріальні катехолдіоксигенази спричиняють деградацію ароматичних вуглеводнів за наявності кисню. Першим етапом є приєднання атомів молекулярного кисню до катехіну (1,2-дигідроксибензолу), чи сполукам, що подібні до нього. Надалі відбувається розщеплення ароматичного кільця.

Вищеописане аеробне розщеплення вуглеводнів є ефективним на ділянках суходолу, чи на поверхні водних джерел. Проте, існує велика кількість

середовищ, доступ кисню у яких обмежений (мангрові зарості, донні відкладення). В подібних умовах спостерігається перебіг анаеробних процесів розкладання токсикантів. При такому типі деградації сполуки нафтової фракції перетворюються в бензоїл-КоА, а залученим ферментом є бензоїл-КоА-редуктаза. Кінцевим акцептором електронів вважається сульфат, нітрат, чи трьохвалентне залізо [14].

Таблиця 1.3

**Порівняння аеробного та анаеробного розщеплення вуглеводнів [14].**

Характеристика	Аеробна деградація	Анаеробна деградація
Наявність кисню	Присутній	Відсутній
Сполуки, утворені в результаті процесу	CO <sub>2</sub> і H <sub>2</sub> O	CH <sub>4</sub> , CO <sub>2</sub> та H <sub>2</sub> , ацетат
Швидкість перебігу процесу	Висока	Низька
Ефективність	Висока	Середня
Субстрати	Аліфатичні, ароматичні вуглеводні	Бензоїл-КоА-похідні, алкани
Ферменти	Оксигенази, алкангідроксилази, катехолдіоксигенази	Бензоїл-КоА-редуктаза, дегідрогенази

Згідно з описаною інформацією, розщеплення вуглеводнів за допомогою мікроорганізмів є ефективною стратегією усунення нафтових розливів. Визначено, що аеробна деградація є більш швидкою та результативною, проте анаеробні процеси також варто залучати з ціллю очищення середовищ, доступ кисню у яких є обмеженим.

### 1.3. Вплив факторів середовища на ефективність біодеградації нафти

#### 1.3.1. Вплив фізико-хімічних параметрів на активність мікроорганізмів

Температура вважається ключовим фактором, що великою мірою впливає на ефективність деструкції сполук нафтової фракції. Низькі температури відповідно спричиняють зниження швидкості біодеградації через сповільнення роботи ферментативних систем мікроорганізмів. В свою чергу, температурним оптимумом для суходолу вважається діапазон 30-40 °С, оскільки метаболічні перетворення за цих значень найактивніші. В морських джерелах ефективний перебіг розщеплення вуглеводнів фіксується при 20-30 °С. Для прісноводних водойм підходяща температура знаходиться в межах 15-20 °С. Не зважаючи на наведені показники, вчені зазначили, що бактерії в морській воді мають здатність розкласти сиру нафту при температурі, яка перевищує 30 °С. На противагу, деструкція вуглеводнів фіксується і за наднизьких температурних значень (-1,1 °С) в ґрунтовому середовищі. Певні групи сполук, як-от ПАВ, при від'ємній температурі не піддаються розщепленню мікроорганізмами [16].

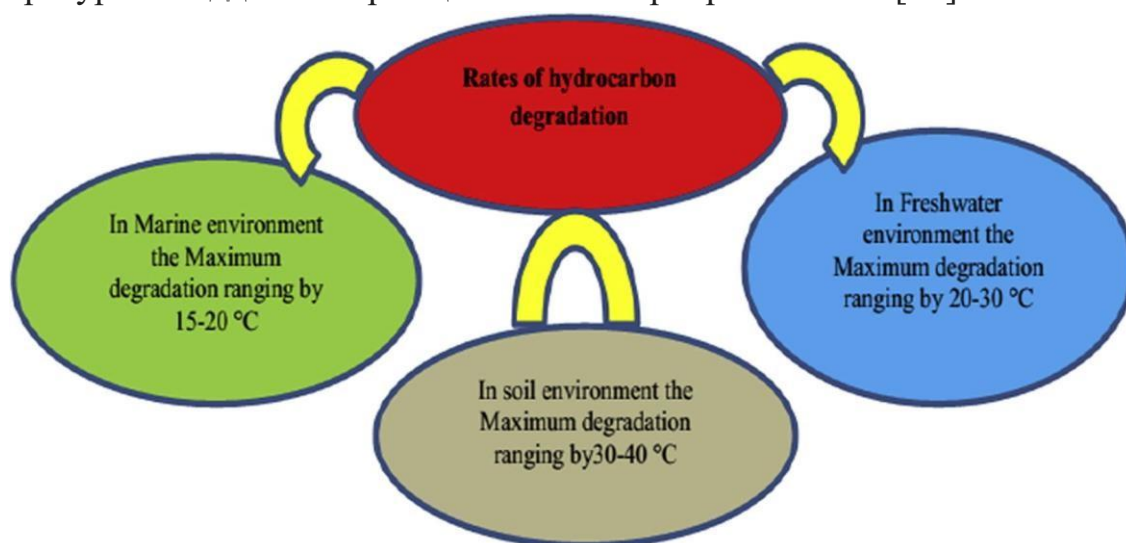


Рис 1.4 Вплив температури на швидкість біодеградації в різних середовищах [16].

Раніше було зазначено, що при біостимуляції в контексті біоремедіації забруднених територій до середовища вносять макро- та мікроелементи. У водоймах нафтові розливи є причиною зниження рівнів азоту та фосфору, а також підвищення вмісту вуглецю. Спираючись на це, у морських і прісноводних джерелах необхідно відновлювати баланс поживних речовин, що був порушений через забруднення вуглеводнями. Варто зазначити, що перенасичення поживними речовинами призводить до неефективної мікробної деградації. Вчені виявили, що для синтезу ліпаз *Lasiodiplodia theobromae*, *Penicillium chrysogenum*, *Mucor racemosus* в якості джерела вуглецю найкраще додавати целюлозу та сахарозу. До того ж, дані мікроорганізми проявляють високу активність при внесенні дріжджового екстракту, який приймає участь в азотному живленні. Дослідники підкреслили, що штами *Trichoderma spp.* краще розкладають ПАВ у разі додавання пірена як ключового джерела вуглецю, а також 0,1% лактози, 0,02% дріжджового екстракту, 0,1% сахарози. Підсумки підбивали на 7 та 14 добу експерименту [17].

Швидкість перетворення токсикантів на безпечні метаболіти корелюється з солоністю середовища. При підвищенні солоності на 3,3-28,4% ефективність біодеградації знижується. Кислотність також є фактором впливу на результативність розщеплення сполук нафтової фракції. рН діє не лише на активність ферментних систем, а й на транспорт речовин, каталіз реакцій. Гетеротрофні бактеріальні агенти розвиваються у нейтральному, чи слабколужному середовищі, тоді як мікроміцети виявляють стійкість до більш кислих умов. Окиснення октадекану та нафталіну відбувається при значенні рН 6,5, проте при зміні рН на слабколужне (8,0) мінералізація октадекану збільшується, а нафталіну – ні. Вчені зазначили, що максимізації біодеградації нафти *Pseudomonas aeruginosa* сприяє слабколужна реакція водного середовища (8,0). Мікроорганізми найкраще розщеплюють нафтові відходи при рН 7,8. *Burkholderia cocovenenans* найліпше розкладає фенантрен в ґрунті при рН на рівні 6,5-7, тобто в слабкокислому, чи нейтральному середовищі.

На суходолі деструкція вуглеводнів не завжди приносить бажаний результат внаслідок низького відсотка доступної води. Мікроорганізми застосовують воду в процесі метаболічних перетворень, для власного росту, розвитку та переміщення. Наукова література вказує на підвищення ефективності деградації в разі насичення нафтових відходів водою на 30-90%. Смоляні кульки, що локалізуються на прибережних територіях, майже не піддаються розщепленню через фактичну відсутність доступної води та щільну структуру [16].

Отже, ефективність деструкції нафти та нафтових відходів корелюється зі значеннями температури, кислотності та солоності середовища, вмістом поживних речовин, кількістю доступної води.

### ***1.3.2. Стимуляція деструкції нафти мікроорганізмами***

Підхід «зверху вниз» використовують з метою створення консорціумів мікроорганізмів. До вже існуючої бактеріальної спільноти вносять нові штами. Ефективність деструкції вуглеводнів зростає через розширення спектру субстратів, що підлягають розщепленню. Китайські вчені сконструювали консорціум, що включав *Cupriavidus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Gordonia spp.* та *Paenibacillus spp.* Наведені мікроорганізми є продуцентами біосурфактантів, які інтенсифікують розкладання сполук нафтової фракції іншими бактеріями, мікрومیцетами.

Підхід «знизу вгору» є двоетапним. Спочатку мікроорганізми підвищують доступність вуглеводнів за допомогою синтезу ПАР та шляхом хемотаксису. Поверхнево-активні речовини збільшують діапазон доступних субстратів внаслідок появи можливості до розкладання нерозчинних у воді сполук. Потім вуглеводні потрапляють до клітин мікроорганізмів завдяки пасивному, чи активному транспорту, дифузії, ендоцитозу, відбувається розщеплення.

Генна інженерія є одним з методів підвищення показників деградації нафти, збільшення типів вуглеводнів, які підпадають під деструкцію. Вчені

сконструювали бактеріальний штам, що розкладає компоненти дизельного пального. Для цього ген *alkB* (алкангідроксилаза) вводили в *Escherichia coli*. Швидкість розщеплення дизельного палива збільшилась з 31% до 50% лише за добу. Актуальним є посилення синтезу ПАР мікроорганізмами з метою покращення доступності сполук нафтової фракції. Для цього науковці сконструювали штам *Bacillus subtilis 168* за допомогою введення в бактерію активаторів синтезу ПАР, посилення транспорту попередників жирних кислот, “вимкнення” конкуруючих шляхів.

Окремо варто виділити покращення біодеградації вуглеводнів за рахунок регулювання міжвидових відносин всередині консорціумів. Прикладом є конструювання асоціації з 3 видів бактеріальних агентів, що значно швидше розкладали фенантрен внаслідок синергетичної взаємодії. В певних випадках штучні консорціуми є не тільки міжвидовими, а й включають бактерії та мікроміцети. Вчені створили консорціум на основі 4 видів бактеріальних агентів, 3 видів дріжджів та 8 видів грибів. Для одержання результатів оцінювали ефективність деструкції нафти та нафтових відходів при використанні наступних культур: бактеріальної змішаної, бактеріально-грибною змішаною та грибною змішаною. Синергетична взаємодія в кожному з випадків обумовлювала збільшення результативності розщеплення вуглеводнів [18].

Актуальним є внесення хімічних окисників в ґрунтове середовище, оскільки вони позитивно впливають на кількість мікроорганізмів-деструкторів. Біодеградацію інтенсифікують перманганат калію (втричі зменшує концентрацію мазуту та в п'ять разів знижує відсоток забруднення дизельним паливом в середовищі за 4 та 5 місяців відповідно), перекис водню (90% і 88% ефективності розщеплення дизельного палива та мазуту відповідно). Окисник підбирають згідно з температурою довкілля, типом забруднюючої речовини, видом мікроорганізму. В разі необхідності отримання швидкого результату вносять допоміжні хімічні речовини, тому що в такому разі час, затрачений на деструкцію, скорочується [19].

Таким чином, основними шляхами стимуляції розкладання сполук нафтової фракції мікроорганізмами є створення штучних консорціумів за допомогою одного з підходів («зверху вниз» або «знизу вгору»), використання генної інженерії, що передбачає введення в модельний організм гену, відповідального за розщеплення вуглеводнів, внесення в ґрунтове середовище окисників (перманганат калію, чи пероксид водню).

#### **1.4. Проблеми та перспективи**

##### ***1.4.1. Основні проблеми застосування мікроорганізмів у біоремедіації***

Найпершою проблемою виступає залежність від параметрів навколишнього середовища. Спираючись на те, що ферментативні системи найкраще функціонують в діапазоні 15-40 °С відповідно до конкретного біоценозу, відхилення від оптимальних значень передбачає загибель мікроорганізмів-деструкторів. Нестача, надлишок, чи неправильне співвідношення поживних речовин у ґрунті викликає зниження ефективності метаболічних перетворень. Зміна рН на сильнолужне або сильнокисле має фатальний ефект відносно деяких груп мікроміцетів, бактерій. Нестача доступної води спричиняє фактичну неможливість розщеплення сполук нафтової фракції мікроорганізмами. Підвищення солоності загрожує зниженню результативності біодеградації [16].

Якщо у ґрунті вже міститься достатня кількість мікроорганізмів, вони можуть вступати в конкурентну взаємодію з нафтоокислювачами та пригнічувати ріст і розвиток останніх. Було згадано, що в разі забруднення в середовищі зростає кількість вуглецевих джерел, тому автохтонні та екзогенні штами «змагаються» за субстрат. Навіть коли місцеві асоціації не здатні ефективно розкласти нафту, вони продукують певну кількість вторинних

метаболітів (приклад – антибіотики), через які ферменти нафтодеструкторів не розкладають вуглеводні належним чином [20].

Розглядаючи біохімічні реакції, які лежать в основі біодеградації нафтових компонентів, варто згадати, що перетворення складних вуглеводнів (наприклад ПАВ) є кількаступеневими. Через це певні проміжні сполуки є токсичними. На розщеплення навіть проміжних речовин витрачається певний проміжок часу за який вони здатні нанести ще більшу шкоду середовищу. До того ж, хоча нафтоокислювачі є стійкими до вуглеводнів, ці мікроорганізми не завжди витримують дію утворених токсикантів [21].

Біопрепарати на основі мікроорганізмів-деструкторів не набули поширення на ринку, їх неможливо купити за потреби. Однією з причин є необхідність бактерій та грибів, що розкладають вуглеводні, живитись нафтою та її відходами, оскільки для більшості з них дані сполуки є основними джерелами вуглецю. Подібні умови важко підтримувати, а нестача сполук нафтової фракції може викликати загибель. Іншою проблемою є відносна недовговічність препаратів, до складу яких входять нафтоокислювальні мікроорганізми. Транспортування на далекі відстані, чи недотримання умов зберігання завдає фатальної шкоди для консорціумів. Строк придатності у суспензійних форм є обмеженим.

Отже, до основних проблем варто віднести залежність від температури, кислотності, солоності середовища, кількості поживних речовин та доступної води, пригнічення екзогенних штамів автохтонними консорціумами, утворення проміжних токсичних сполук, які несуть шкоду як довкіллю, так і мікроорганізмам, недовговічність біопрепаратів при транспортуванні та відсутність в них нафти як джерела вуглецю, обмежений строк придатності у суспензійних біопрепаратів.

#### ***1.4.2. Перспективи використання методів біодеструкції нафти***

Актуальним підходом є створення біопрепаратів, що включають бактеріальні та грибні види, а також додаткові елементи (приклад – окисники типу пероксиду водню, чи перманганату калію) для інтенсифікації розкладання вуглеводнів. Активізація метаболічних шляхів для прискорення розщеплення нафти можлива завдяки генно-інженерним підходам та введенню в модельні організми генів, які відповідають за деструкцію. За допомогою таких маніпуляцій відбувається перебіг паралельних реакцій та одночасне розщеплення більш простих і складних сполук. Для підвищення життєздатності асоціацій мікроорганізмів варто вносити додаткові елементи, що підтримували б ріст і розвиток нафтоокислювачів, подовжували термін зберігання біопрепаратів, як-от стабілізатори [16].

Оскільки найпоширенішими для ліквідації нафтових розливів є механічні та фізичні методи, а їх застосування буде спостерігатись ще довгий час, пропонується запроваджувати комплексний підхід. Тобто на першому етапі потрібно залучати механічні (збір нафтопродуктів) та фізичні (дренування, промивка) методи, а на другому – біотехнологічні. Стандартні методики покликані усувати первинне забруднення, а внесення екзогенних штамів має на меті зменшити несприятливий вплив на довкілля, відповідає за остаточне видалення сполук нафтової фракції, звільнення від довгострокових наслідків [22,23].

Однією з причин через яку мікроорганізми не завжди використовуються для ліквідації нафтових розливів є їх сприйнятливість до утворених в процесі деструкції проміжних сполук, оскільки в певних випадках вони є токсичними. Рішенням проблеми є підбір спеціалізованих стійких штамів або ж їх штучне створення. Це можливо завдяки природному відбору, мутагенезу, селекції та генетичній інженерії. Якщо гриби та бактерії деякий час піддавати впливу несприятливих умов, то можна обрати найстійкіші ізоляти. В контексті генетичної інженерії варто не лише працювати з генами, які відповідають за

біодеградацію, а й зі структурами, які підтримують резистентність до окремих груп сполук, чи факторів середовища [18,24].

Перспективним є коригування умов довкілля на основі проведення моніторингу. В ґрунті та водних джерелах необхідно встановлювати біосенсиори безпосередньо перед здійсненням біоремедіації. Новітні прилади відкривають шляхи для визначення числа забруднюючих речовин, виявлення активності штамів-деструкторів. Базуючись на спостереженнях можна підібрати види, що найефективніше здатні розщеплювати вуглеводні в конкретних умовах відносно наявних типів токсикантів [25].

Таким чином, залучення мікроорганізмів до біодеградації сполук нафтової фракції є перспективним методом ліквідації нафтових розливів. Актуальним є створення біопрепаратів, що містять бактеріальні та грибні види, додаткові хімічні речовини, використання комплексу механічних, фізичних та біотехнологічних підходів, застосування природного відбору, мутагенезу, селекції, генної інженерії, проведення моніторингу за допомогою біосенсорів та коригування зовнішніх умов згідно зі спостереженнями.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1. Підбір середовища для культивування мікроорганізмів-деструкторів

#### 2.1.1. Проаналізовані середовища

Перед проведенням експериментальної частини необхідно було проаналізувати існуючі дослідження, а в особливості поживні середовища, які застосовуються для культивування бактеріальних та грибних агентів. Згідно з даними, перше розглянуте мінеральне середовище для росту й розвитку бактерій-деструкторів містило наступні компоненти ( $\text{г}^{-1}$ ): 5,0  $\text{NaNO}_3$ ; 0,86  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,56  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,37  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,17  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ; 0,007  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Також застосовували 25  $\text{мл} \cdot \text{л}^{-1}$  розчину мікроелементів, який включав ( $\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$ ): 2,32  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 1,0 EDTA; 0,66 KI; 0,4  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,39  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,004  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . рН доводили до 7,0 [26].

Опрацьована література вказувала на використання наступних середовищ для культивування мікроорганізмів-деструкторів з метою біоремедіації забруднених територій:

- Середовище для бактерій ( $\text{г/л}$ ): 5,0  $\text{NaCl}$ ; 3,0  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 2,0  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 2,0  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,02  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 1% дизельного пального.
- Середовище для дріжджів ( $\text{г/л}$ ): 5,0  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,85  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,5  $\text{MgSO}_4$ ; 0,15  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,1  $\text{CaCl}_2$ ; 0,1  $\text{NaCl}$ ; 1% дизельного пального.
- Агар Чапека ( $\text{г/л}$ ): 3,0  $\text{NaNO}_3$ ; 1,0  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5  $\text{KCl}$ ; 0,01  $\text{FeSO}_4$ ; 1% дизельного пального [27].

Спираючись на досвід вчених з Бангладешу, досліджено середовище для росту бактерій, які розкладають вуглеводні, що входять до складу нафти. Описане середовище характеризувалось наступним складом ( $\text{г/л}$ ): 2,0  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ;

0,5  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,4  $\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,4  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,05  $\text{MgSO}_4$ ; 0,04  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,02  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . рН доводили до 7,0 використовуючи 0,005% твін 20, різні концентрації моторного масла та дизельного пального [28].

Відповідно до праць індійських науковців, для виділення та подальшого культивування бактеріальних агентів застосовували агар Бушнелла-Хааса, який мав такий склад (г/л): 1,0  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,0  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 1,0  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 0,2  $\text{MgSO}_4$ ; 0,05  $\text{FeCl}_3$ ; 0,02  $\text{CaCl}_2$ . Додавали 10 мл сирої нафти, 15 г агару. рН доводили до оптимального значення 7,2 [29].

### *2.1.2. Оптимізоване середовище для культивування ізолятів*

Грунтуючись на іноземних експериментальних даних [26,27,28,29], для росту та розвитку мікроорганізмів-деструкторів було обрано середовище, яке включало компоненти шести раніше проаналізованих.

Таблиця 2.1

#### **Склад середовища, яке використовувалось для культивування мікроорганізмів-деструкторів нафти**

<b>Компонент</b>	<b>Концентрація (г/л)</b>
NaCl	5,0
$\text{MgSO}_4$	2,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,5
$\text{NaNO}_3$	1,5
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,15
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,15
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{CaCl}_2$	0,01
$\text{FeSO}_4$	0,01
Агар	7

Для приготування 1 л поживного середовища всі наведені речовини зважували на аналітичних терезах, вносили в колбу відповідного об'єму, заливали 1 л холодної дистильованої води. Ємність із сумішшю закривали корковою пробкою, обережно перемішували та нагрівали нетривалий час з метою досягнення абсолютного розчинення компонентів. Обраний метод стерилізації – автоклавування за допомогою вологого жару. Процес тривав 15 хв під тиском 1 атм і за температурного значення 121 °С. рН дорівнював 7,0. Середовище розливали у стерильні чашки Петрі поблизу полум'я спиртівки для збереження асептичних умов. Посудини заповнювали приблизно на 30%.



Рис. 2.1. Розлив поживного середовища у чашки Петрі. Джерело: фото автора.

Перед тим як середовище в посудинах повністю застигло, в кожну чашку Петрі вносили по 1 мл нафти/дизельного пального/бензину А-95. Використаний інструмент – саплер. Надалі рідини рівномірно розподіляли на середовищі. Варто зауважити, що всі застосовані речовини є легкозаймистими, тому спиртівку гасили.

Нафта, бензин та дизель є основними джерелами вуглецю та енергії в середовищі для росту та розвитку мікроорганізмів-деструкторів, оскільки стандартні речовини подібного спрямування (пептон, глюкоза та інші) відсутні.

Поживне середовище є селективним, тому що всі наведені розчини містять алкани, циклоалкани, ароматичні вуглеводні та невелику частку асфальтенів, які підходять для підтримання життєздатності та катаболізму лише окремих груп бактерій, мікроміцетів.



Рис. 2.2. Доповнення середовища нафтою, дизельним паливом та бензином. Джерело: фото автора.

## **2.2. Метод серійних десятикратних розведень**

### ***2.2.1. Вибір проб ґрунту та підготовка зразків***

В якості першого місця відбору проб обрано озеро Кирилівське м. Києва. Через те, що площа ділянки перевищує показник в 100 м<sup>2</sup>, кількість точок, з яких вилучали ґрунт – 5. Для початку знімали верхній шар покриву товщиною приблизно 2 см, а вже потім стерильним шпателем брали зразок та поміщали в банку, що зроблена зі скла. Ємність міцно закривали пробкою. Наповнення

посудини ретельно перемішували. Інструменти після закінчення процедури замочували в 70% етилені.

Матеріалом для другої проби слугував ґрунт, який був направлений на аналіз до Інституту агроєкології і природокористування НААН. Його особливістю є місце вилучення (ділянка падіння уламків дрона). Аналогічно до попереднього, даний зразок переносили в скляну банку, закривали пробкою і струшували для досягнення більш однорідної маси.

З обох проб виймали побічні структури (рослинні залишки, шматки металу та інші часточки). Перший одержаний зразок аналізували в день відбору, тоді як другий – через дві доби після надходження до установи. Тобто 48 годин проба знаходилась в холодильнику [30].

### ***2.2.2. Приготування ґрунтової суспензії***

На попередньо простерилізованих скельцях зважували по 10 г кожного з підготовлених зразків. З метою отримання однакових за розміром частинок, ґрунт розтирали в ступці, а далі – просіювали через дрібнопористе сито. Одержані наважки додавали до двох колб, кожна з яких мала об'єм 250 мл і наливали по 90 мл дистильованої води. Проби переносили на шейкер, де залишали їх на 30 хв та відстоювали ще 5 хв [30].

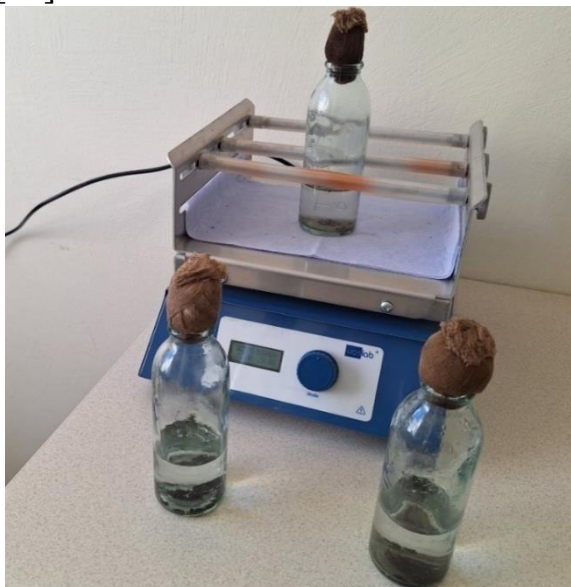


Рис. 2.3. Відстоювання проб. Джерело: фото автора.

Перше розведення – це суміш 10 г ґрунту та 90 мл води ( $10^{-1}$ ), тобто співвідношення між масами ґрунту та суміші загалом. Друге та третє послідовні розведення ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) отримували за допомогою внесення 1 мл ґрунтової суспензії з першої пробірки в другу, а вже з другої – в третю [30].

### ***2.2.3. Посів мікроорганізмів***

Спираючись на класифікацію за консистенцією, згідно з якою обране поживне середовище належить до щільних, висів мікроорганізмів робили поверхнево. Для цього самплером відбирали 1 мл суспензії, переносили у чашку Петрі та використовували стерильний шпатель Дригальського, щоб рівномірно розподілити рідину. Полум'я спиртівки гасили для унеможливлення займання. Посів одержаних десятикратних розведень з ґрунтової проби, відібраної поблизу озера Кирилівського, здійснювали на 30 чашок (10 шт – середовище з нафтою, 10 шт – середовище з дизельним паливом, 10 шт – середовище з бензином А-95). Аналогічно з цим, посів розведень, що були отримані з ґрунту, взятого з місця падіння уламків дрону також здійснювали на 30 чашок Петрі. Застосовані серійні розведення –  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  [30].



Рис. 2.4. Посів мікроорганізмів. Джерело: фото автора.

По закінченню процесу чашки Петрі переносили в термостат, де температура підтримувалась на рівні 25 °С. Оскільки для мікроорганізмів-деструкторів нафти та її похідних притаманний повільний ріст, культивування тривало 4 тижні.



Рис. 2.5. Ізоляти в термостаті. Джерело: фото автора.

## 2.3. Ідентифікація мікроорганізмів

### 2.3.1. Мікроскопія

У візуальному дослідженні з метою визначення морфологічних особливостей колоній використовували світловий мікроскоп. Його ключові характеристики – збільшення об'єкту в 1000 разів (розраховується як добуток збільшень об'єктиву та окуляра), роздільна здатність 0,2 мкм (мінімальна відстань поміж двох точок, що видно роздільно). Застосовували штучне освітлення досліджуваних зразків.

Відповідно до класифікації, виокремлюють п'ять типів світлової мікроскопії (світлопольна, темнопольна, фазово-контрастна, люмінісцентна та

імерсійна). Зважаючи на те, що світлопольна мікроскопія є найрозповсюдженішим видом, використовували саме її. Для спостереження за мікроорганізмами потрібно, щоб зразки пропускали світло (були принаймні частково прозорими). Застосовували промені видимого спектру. Зображення одержували через різницю в рівнях світлопоглинання різноманітними зонами об'єкту дослідження. Під час проходження світла через мазок фіксувалась зміна інтенсивності світла [31].



Рис. 2.6. Світловий мікроскоп, який використовували під час дослідження.

Джерело: фото автора.

Перший приготований препарат має назву «відбиток». Він придатний для встановлення морфологічних ознак мікроміцетів. Для початку з середовища для росту грибів за допомогою скальпеля вирізали невеликий кубик та розташовували його на предметному склі таким чином, щоб колонії мікроорганізмів знаходились зверху. До кубика легенько притискали покривне скельце, яке знімали не зрушуючи в сторону. Одержаний препарат переносили відбитком донизу в краплю дистильованої води на предметне скло та досліджували [32].

Другий препарат – це «роздавлена крапля», який підходить для візуальної ідентифікації бактеріальних агентів. Для початку краплю дистильованої води наносили на предметне скло. З використанням бактеріологічної петлі відбирали невелику кількість культури та переносили її на предметне скло з краплею, обережно перемішуючи після цього препарат. Зразок накривали покривним скельцем. Обов'язкова умова проходження процесу – відсутність пухирців повітря [33].

### ***2.3.2. Фарбування за Грамом***

Фарбування за Грамом є одним з найвідоміших методів, який застосовується для віднесення бактеріальних ізолятів до грампозитивних або грамнегативних відповідно до товщини шару пептидоглікану та особливостей зовнішньої мембрани.

Відбір зразків проводився з поверхні середовища за допомогою бактеріологічної петлі. Їх поміщали на стерильне предметне скло та перемішували у краплі фізіологічного розчину. Висушування мазка проводили за температури 22 °С з постійним доступом повітря. Використаний метод фіксації – фізичний. Предметне скло тричі проводили над полум'ям спиртівки, здійснювали охолодження. Мета етапу – запобігання змивання мікроорганізмів під час проведення дослідження.

Фарбування вважалось складним, тому що застосовували декілька видів барвників. На мазок наносили генціанвіолет та витримували 1,5 хв. Надалі зразок покривали розчином Люголя і також витримували 1,5 хв. Кількість доданих барвників – по дві краплі кожного. По закінченню часу витримання розчин Люголя змивали. Мазок обробляли етиловим спиртом (96%) та витримували 30 с, здійснювали промивання. Вносили сафранін (барвник) у розмірі двох крапель та після одноквилинного витримання проводили його змивання водою. Матеріал для висушування – фільтрувальний папір.

Досліджуваний об'єкт переміщали під об'єктив світлопольного мікроскопа. В разі, якщо забарвлення бактеріальних агентів темно-фіолетове – вони є грампозитивними. У випадку коли колір стає рожево-червоним – мікроорганізми грамнегативні [34].

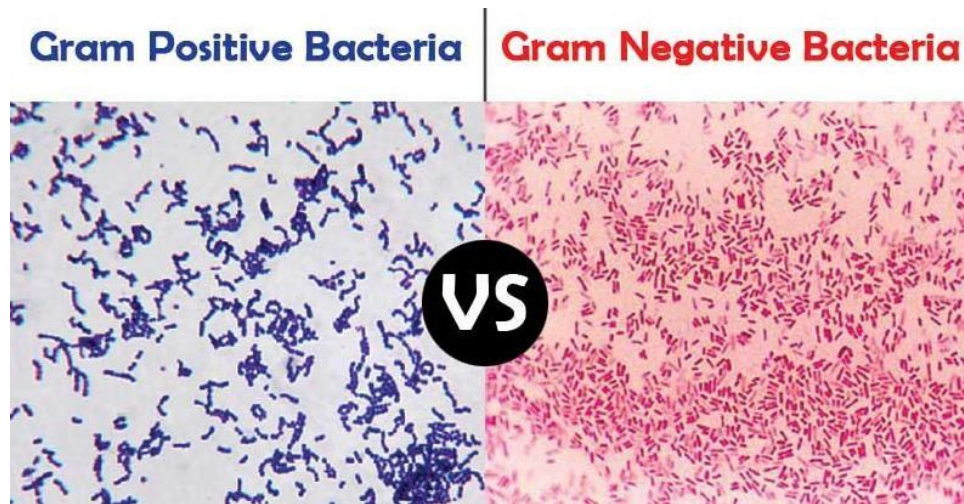


Рис. 2.7. Відмінності в результатах фарбування грампозитивних та грамнегативних бактерій [35].

### ***2.3.3. Біохімічні тести***

Встановлення родової належності ізолятів розпочинали з проведення найпростіших тестів. Перший з них (визначення ферменту каталази) передбачав внесення на поверхню культури 2 мл 1% перекису водню за допомогою самплера. Якщо реакція є позитивною – з'являються пухирці газу, якщо ж ні – їх поява не спостерігається. Другий тест допомагав виявити оксидазу. Для цього колонії переносили на спеціальні смужки з N-диметил-1,4-фенілендіаміном, використовуючи бактеріальну петлю. При фіксації через 2-4 хв синього забарвлення тест вважався позитивним. При відсутності змін – негативним.

Надалі визначали протеолітичну активність культури. Для цього використовували середовище МПБ такого складу: 1% пептон, 0,5% NaCl, м'ясна вода. Поживне середовище стерилізували в автоклаві за стандартним протоколом. Культуру сіяли в пробірки з 5 мл МПБ, вносили індикаторний папірець на індол та приблизно 65% від його загальної довжини фіксували

пробкою біля стінки пробірки. В разі, якщо смужка стає блідо-рожевою, тест вважається позитивним [36].

З метою встановлення можливості утилізувати цитрат застосовували агар Сіммонса наступного складу (г/л): 5,0 натрію хлорид; 2,0 цитрат натрію; 0,80 амоній натрій фосфат; 0,80 первинний кислий фосфат амонію; 0,20 магнію сульфат; 0,08 бромтимоловий синій; 15,0 агар [37]. Поживне середовище стерилізували в автоклаві за стандартним протоколом та розливали у чашки Петрі. Посів мікроорганізмів здійснювався штрихом. При рості бактерій та зміні кольору середовища на синій тест є позитивним [36].

Окрім цього, використовували реакцію Фогеса-Проскауера для виявлення утворення ацетоїну при зброджуванні глюкози. Обрано середовище Кларка такого складу (г/л): 7,0 пептон; 5,0 глюкоза; 3,0 дигідрофосфат калію; 2,0 фосфат натрію [38]. Середовище стерилізували і розливали у пробірки. Для посіву мікроорганізмів застосовували метод штриха. До 1 мл мікробної культури вносили 0,6 мл  $\alpha$ -нафтолу та 0,2 мл 40% розчину гідроксиду калію. Якщо після перемішування колір змінювався на вишнево-червоний, то реакція вважалась позитивною [36].

З метою встановлення цукролітичних властивостей використовували середовище Гісса наступного складу (г/л): 3,7 пептон; 3,0 хлорид натрію; 2,5 агар; 0,5 гідрофосфат натрію; 0,02 бромкрезоловий пурпурний. Поживне середовище доповнювали 3,78 г/л одного з компонентів – лактоза, сахароза, мальтоза [39]. Тобто готували 3 варіації поживного середовища. Його стерилізували і розливали у пробірки. Культуру мікроміцета сіяли штрихом. Фіксація зміни кольору середовища вказує на розкладання вуглеводу з утворенням кислоти [36].

## 2.4. Ефективність біодеградації

Мікроорганізми пересіювали на рідке середовище для культивування склад якого був еквівалентний до початкового оптимізованого поживного середовища,

але без додавання агару. Для цього в три колби об'ємом 250 мл вносили по 98 мл культури та по 2 мл нафти, а в інші три – по 98 мл культури та по 2 мл дизельного палива. Серед трьох колб в кожному з варіантів перша містила культуру бактеріальних агентів, друга – мікроміцетів, а третя – змішану культуру грибів та бактерій (1:1). Також брали 2 колби з середовищем, перша з яких була доповнена нафтою, а друга – дизельним паливом, мікроорганізми не вносили для того, щоб оцінити відсоток природного випаровування. Час культивування становив 2 тижні за температури 25 °С, культури поміщали на кругову качалку (120 об/хв).

Для визначення біодеградаційного потенціалу мікроорганізмів застосовували метод гравіметрії. Залишки нафти та дизельного палива в кожному зразку екстрагували шляхом внесення 50 мл хлороформу, суміш ретельно перемішували. Екстракти центрифугували 30 хв при 4500 об/хв, відбирали залишки нафти та дизельного палива. Після фазового розділення до кожного зразка додавали 3 г безводного  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  з метою осушення, екстракт декантували. Його переносили в пробірки об'ємом 5 мл і витримували при температурі 75 °С протягом 4 год. та при 40 °С протягом ночі для видалення залишків хімічних речовин. Зважування сухої маси проводили на аналітичних терезах. Результат порівнювали з вагою контрольних зразків сухої нафти та дизельного палива [28,40]. Показник біодеградації нафти розраховували за формулою:

$$\text{Відсоток біодеградації} = \left( \frac{\text{вага контролю} - \text{вага зразка}}{\text{вага контролю}} \right) \cdot 100\%, \quad (2.1)$$

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 3.1. Колонії мікроорганізмів

Через 4 тижні інкубування оцінювали розміри колоній, їх морфологічні особливості, здатність рости на середовищах з різними джерелами вуглецю (бензин А-95, нафта, дизельне паливо).

Колонії мікроорганізмів, що були одержані після проведення методу серійних десятикратних розведень з ґрунтової проби, взятої з місця падіння уламків дрону, відзначались округлою формою, їх розмір був неоднаковим. Забарвлення ізолятів – коричневе, чітко видно, що центральна частина колоній мала темно-коричневий колір, тоді як краї характеризувались світло-коричневим забарвленням. Колонії блискучі, непрозорі та гладкі, міцеліальні структури як у грибів відсутні, тому можна припустити, що досліджуваним об'єктом є бактерії. Варто зазначити, що колонії формувались на поживному середовищі, що було доповнене нафтою та дизельним паливом, тоді як на середовищі з бензином А-95 вони не утворювались.

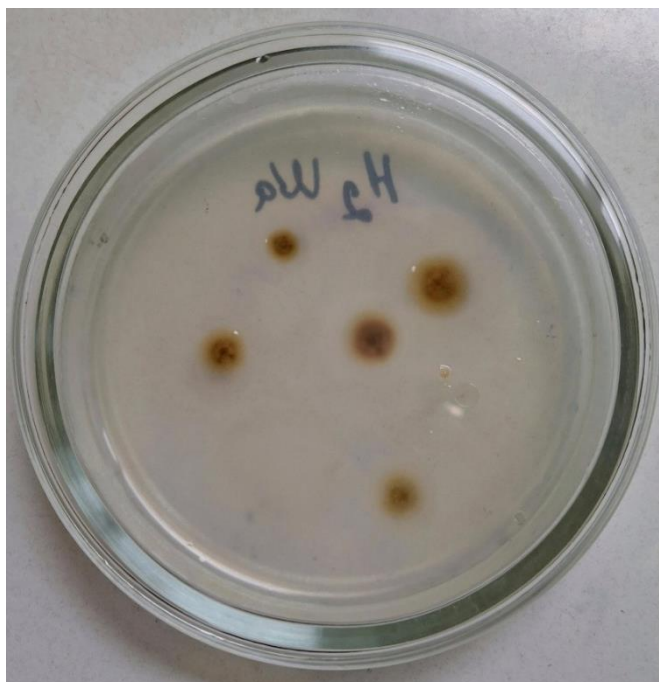


Рис. 3.1. Колонії мікроорганізмів на середовищі, доповненому дизельним паливом. Джерело: фото автора.

В свою чергу, колонії мікроорганізмів, які були отримані після проведення методу серійних розведень з ґрунтового зразка, вилученого з ділянки поблизу озера Кирилівського, не мали чітких країв, переважно округлі, проте в деяких фіксувалася неправильна форма. Ізоляти були прозорими, а краї колоній – чорні. Колонії розташовані нерівномірно, їх розмір сильно варіювався. Блиск відсутній, але загалом вони пухкі, морфологічно нагадують мікроміцети внаслідок наявності міцеліальних структур. Колонії спостерігались на середовищі, в яке вносили нафту та дизельне паливо, але додавання бензину А-95 не сприяло росту мікроорганізмів.

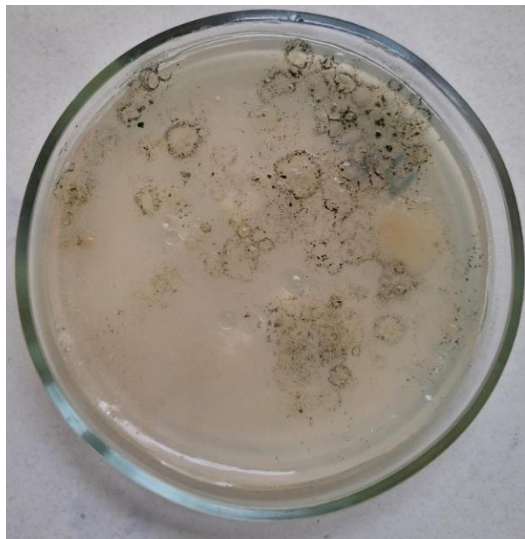


Рис. 3.2. Колонії мікроорганізмів на середовищі з додаванням дизельного палива. Джерело: фото автора.

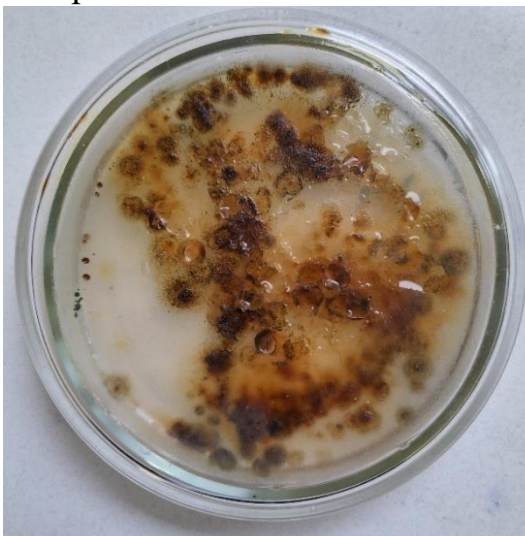


Рис. 3.3. Колонії мікроорганізмів на середовищі з додаванням нафти. Джерело: фото автора.

На рис 3.3 забарвлення колоній змінене з прозорого на темно-коричневе внаслідок внесення нафти. Відсутність колоній на середовищі з бензином А-95 може бути спровокована кількома факторами. Основна відмінність бензину від нафти та дизельного палива – це склад. Він містить вуглеводні, які володіють більшою токсичністю відносно клітин мікроорганізмів, тому в такому середовищі ріст і розвиток бактерій та мікроміцетів обмежується. Іншою причиною може виступати достатньо швидке випаровування бензину з поверхні, через що речовина не є стабільним вуглецевим джерелом. Варто згадати про те, що бактерії та мікроміцети мають дуже різноманітні шляхи розщеплення вуглеводнів, тому є ймовірність, що мікроорганізми, які були наявні в ґрунтовій пробі, не були продуцентами необхідних для деструкції ферментів.

### 3.2. Ідентифікація ізолятів

Мікроскопія вказувала на приналежність ізолятів, одержаних з ґрунтової проби, взятої з місця падіння уламків дрону, до бактерій. Мікроорганізми за формою паличкоподібні, злегка вигнуті, розміщені вони відносно неоднорідно, мають малі розміри, порівняно з грибами.

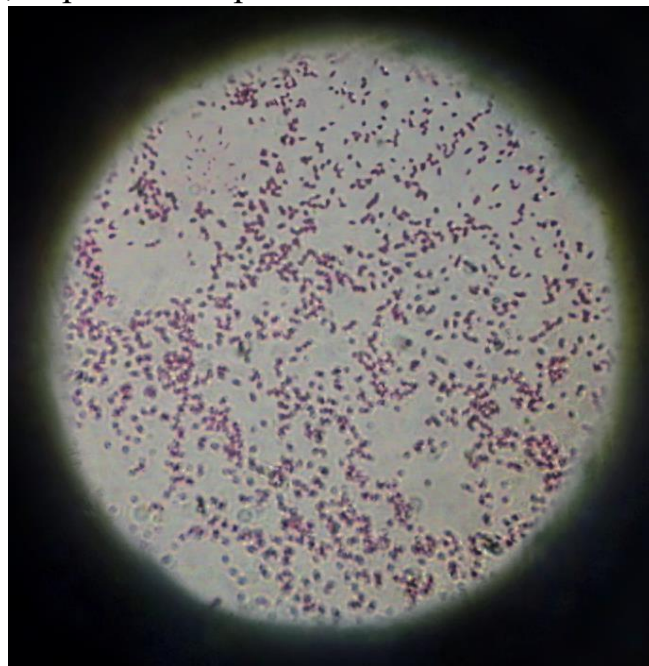


Рис. 3.4. Бактерії під мікроскопом. Джерело: фото автора.

Фарбування за Грамом засвідчувало грамнегативну природу бактерій, тому що їх колір був рожево-червоним після закінчення процесу. Тест на каталазу був позитивним через те, що при внесенні перекису водню на поверхню середовища з'являлися пухирці газу. Ізоляти демонстрували оксидазну активність, оскільки колір застосованої смужки з N-диметил-1,4-фенілєндіаміном змінювався на синій. До того ж, мікроорганізми мали здатність утилізувати цитрат. Ознаку було виявлено на основі зміни кольору агару Сіммонса на синій. На противагу, згідно з реакцією Фогеса-Проскауера, ацетоїн при зброджуванні глюкози не утворювався, вишнево-червоне забарвлення при перемішуванні реактивів з мікробною культурою не спостерігалось. Тест га індол був негативним, оскільки колір індикаторного папірця не змінювався на блідо-рожевий.

Згідно з морфологічними особливостями колоній, результатами мікроскопії, фарбування за Грамом, а також проведеними біохімічними тестами, бактерії належать до роду *Pseudomonas*.

Мікроскопія вказувала на те, що мікроорганізми, отримані з ґрунтового зразка, вилученого з ділянки поблизу озера Кирилівського, належали до мікроміцетів. При дослідженні встановлено, що голівка гриба характеризується чорним забарвленням, округлою формою. Конідієносець, який відходить від голівки, відзначається світлішим кольором, фактично прозорий, прямий. Окремі конідії нечіткі на зображенні, проте темна конідіальна голівка вказує на їх присутність у великій кількості.

Під час визначення цукролітичних властивостей грибів було виявлено, що мікроміцети зброджують лактозу та мальтозу, але не розкладають сахарозу. Подібний висновок базується на зміні забарвлення поживного середовища при утворенні кислоти.

Відповідно до характеристик колоній, візуального спостереження в ході мікроскопії, можливості зброджувати цукри, мікроміцети належать до роду *Aspergillus*.



Рис. 3.5. Мікроміцети під мікроскопом. Джерело: фото автора.

### 3.3. Визначення ефективності біодеградації вуглеводнів

Виявлено, що вага контрольного зразку сухої нафти, одержаного з початкових 2 мл речовини, становила 0,131 г. Вага сухого залишку нафти, отриманого через 2 тижні від початку дослідження з поживного середовища без внесених мікроорганізмів складала 0,121 г. Тобто за період експерименту з середовища природним чином випаровується 7,6% нафти.

Оцінювали рівень деструкції нафти мікроорганізмами, а при підведенні підсумків віднімали відсоток природного випаровування. Зразок нафти, що піддавався впливу бактеріальної культури, після висушування мав вагу 0,099 г. Загальний відсоток біодеградації нафти згідно з формулою 2.1 складав 24,43%, проте при врахуванні рівня випаровування ефективність біодеградації нафти ізолятами *Pseudomonas spp.* становила 16,8%. Висушений зразок нафти, одержаний після культивування в колбі з мікроміцетами, відзначався вагою 0,103 г. Обрахунки проводили аналогічним чином і відповідно до них загальний показник біодеградації знаходився на рівні 21,4%, а ефективність деструкції нафти грибними агентами *Aspergillus spp.* складала 13,7%.

При використанні змішаної культури бактерій та мікроміцетів (1:1) вага сухого залишку знизилась на 28,2% (з 0,131 г до 0,094 г). В свою чергу, ефективність деструкції з врахуванням природного випаровування становила 20,6%. Тобто отримано кращий результат, ніж при застосуванні окремих чистих культур *Aspergillus spp.* та *Pseudomonas spp.*. Це може бути пов'язано з підвищенням ефективності при синергетичній взаємодії мікроорганізмів, а також властивістю розкладати більше типів вуглеводнів. Як відомо, *Pseudomonas spp.* краще розщеплює алкани, а *Aspergillus spp.* – навпаки. Мікроміцет приймає участь в деструкції ПАВ і асфальтенових сполук, проте деградація простих вуглеводнів є не настільки результативною.

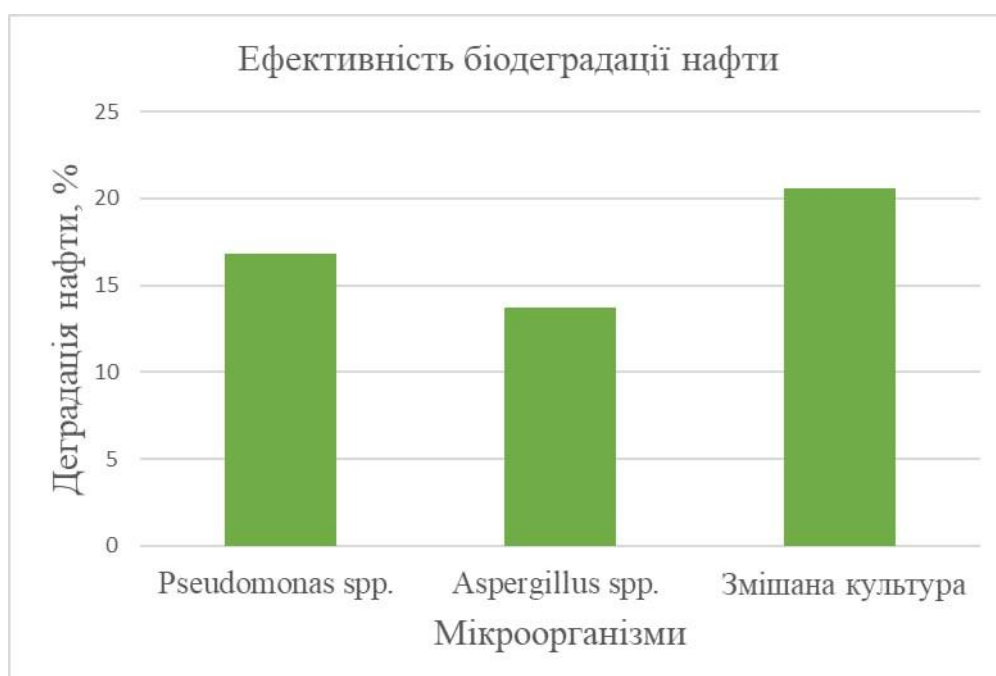


Рис. 3.6. Ефективність біодеградації нафти ізолятами *Pseudomonas spp.*, *Aspergillus spp.* та змішаною культурою мікроорганізмів. Джерело: розроблено автором.

Вага контрольного зразку дизельного палива, отриманого з вихідних 2 мл речовини, складала 0,126 г. Вага сухого залишку дизельного палива, одержаного після 14 діб експерименту з поживного середовища без засіяної культури становила 0,111 г. Таким чином, за наведений проміжок часу з середовища випаровується 11,9% дизельного палива. Одержаний показник випаровування

вищий, ніж у нафті, оскільки дизельне паливо містить більшу кількість простих алканів, вищу леткість.

Під дією бактеріальних агентів та випаровування висушений зразок характеризувався вагою 0,098 г. Загальний показник деструкції становив 31,7%, тоді як ефективність розщеплення компонентів дизельного палива бактеріями роду *Pseudomonas* знаходилась на рівні 19,8%. При культивуванні грибів на середовищі з дизельним паливом одержана суха маса мала вагу 0,095 г. Загальний показник деградації становив 24,6%, а ефективність розкладання дизельного палива *Aspergillus spp.* складала 12,7%.

Залучення змішаної культури *Pseudomonas spp.* та *Aspergillus spp.* спровокувало достатньо суттєве зменшення ваги дизельного палива в сухій формі. Порівняно з 0,126 г контрольного зразка отримано 0,084 г кінцевої маси, різниця становить 33,3%. Враховуючи випаровування ефективність біодеградації складала 21,4%.

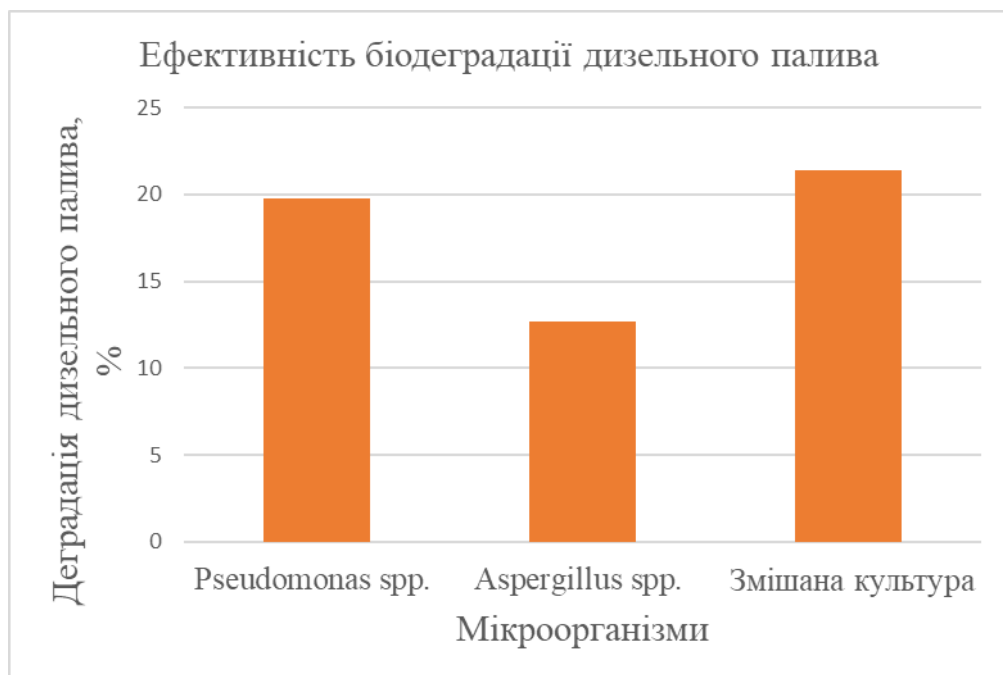


Рис. 3.7. Ефективність біодеградації дизельного палива ізолятами *Pseudomonas spp.*, *Aspergillus spp.* та змішаною культурою мікроорганізмів. Джерело: розроблено автором.

Подібно до результату, одержаного в ході деструкції нафти, ефективність деградації змішаною культурою була вищою. Проте, якщо при спільному культивуванні мікроорганізмів на середовищі з нафтою ефективність розщеплення вуглеводнів підвищилась на 3,8% порівняно із використанням чистої культури *Pseudomonas* та на 6,7% порівняно із використанням чистої культури *Aspergillus*, то кокультивування ізолятів на середовищі з дизельним паливом забезпечило зростання показників біодеградації на 1,6% та 8,7% відповідно. Статистично значущий результат досягнуто саме для мікроміцетів роду *Aspergillus*. Оскільки дизельне паливо переважно містить прості вуглеводні, то як описано раніше, *Pseudomonas spp.* має вищий потенціал до розкладання компонентів. Грибний агент активніше розщеплює складні сполуки, а оскільки в дизельному паливі вони складають меншу частку, він мав нижчу здатність до деструкції.

Бензин-А95 не додавали до рідких середовищ з мікроорганізмами, тому що ріст культур на чашках Петрі з цим джерелом вуглецю не фіксувався. Внаслідок відсутності колоній зроблено висновок про непридатність бензину для розвитку виділених ізолятів, неможливість його деградації вирощеними бактеріями та мікроміцетами.

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено причини нафтового забруднення, кількісний вміст компонентів, що входять до складу нафти, види мікроорганізмів, які використовують в біоремедіації, ферментативні шляхи деструкції вуглеводнів, вплив умов середовища на процес, проблеми та перспективи залучення мікроорганізмів до ліквідації нафтових розливів.
2. Виділено мікроорганізми з ґрунту, визначено, що вони ростуть на поживному середовищі з додаванням нафти та дизельного палива як джерел вуглецю, а на середовищі, що доповнене бензином А-95 колонії не утворюються. Виявлено, що оптимальними умовами є температура 25 °С та рН 7,0.
3. Встановлено, що виділені бактерії належать до роду *Pseudomonas*, тому що вони паличкоподібні, грамнегативні, демонструють каталазну, оксидазну активність, здатність утилізувати цитрат, виявляють негативний результат при проведенні тесту на індол та реакції Фогеса-Проскауера.
4. Визначено, що виділені мікроміцети належать до роду *Aspergillus*, оскільки їх колонії відзначаються темними краями, конідіальна голівка має чорний колір, гриби зброджують лактозу та мальтозу, але не розкладають сахарозу.
5. Виявлено, що ефективність біодеградації нафти ізолятами роду *Pseudomonas* становила 16,8%, мікроміцетами роду *Aspergillus* складала 13,7%, а змішаною культурою мікроорганізмів – 20,6%.
6. Встановлено, що ефективність деструкції дизельного палива бактеріями роду *Pseudomonas* становила 19,8%, грибними агентами роду *Aspergillus* складала 12,7%, а змішаною культурою мікроорганізмів – 21,4%.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. What Causes Oil Spills?. ACME Environmental. 2025. с. 1. URL: <https://acmeboom.com/articles/what-causes-oil-spills/>
2. Oil Spill Pollution. Environmental pollution centers. 2025. с. 1. URL: <https://www.environmentalpollutioncenters.org/oil-spill/causes/>
3. Oil spills. National Oceanic and Atmospheric Administration. 2025. с. 1. URL: <https://www.noaa.gov/education/resource-collections/ocean-coasts/oil-spills>
4. Lecture 8. The composition and properties of oil and oil products. Preparation of oil for processing. Primary methods of refining. Farabi University. 2025. с. 1–15. URL: [https://farabi.university/storage/files/Lecture08\\_ChTOV.pdf](https://farabi.university/storage/files/Lecture08_ChTOV.pdf)
5. Вольчин І.А., Чернявський М.В., Бондаренко В.І. та ін. Хімічний склад та фізичні властивості нафти. Енергетика: історія, сучасність і майбутнє. – Кн. 1: Від вогню та води до електрики. 2013. с. 178.
6. Sharma K., Shah G., Singhal K., Soni V. Comprehensive insights into the impact of oil pollution on the environment. Regional Studies in Marine Science. 2024. с. 15–17.
7. Manasseh M., Humphrey S. Bioremediation of oil spill: concept, methods and applications. Discover Chemistry. 2024. с. 42–47.
8. Helbling D. Bioremediation of pesticide-contaminated water resources: the challenge of low concentrations. Current Opinion in Biotechnology. 2015. с. 142–148.
9. Phian S., Nagar S., Kaur J., Rawat C. Chapter 4 – Emerging issues and challenges for microbes-assisted remediation. Microbes and Microbial Biotechnology for Green Remediation. 2022. с. 47–89.
10. Tanwir K., Javed M., Shahid M., Akram M., Ali Q. Chapter 32 – Antioxidant defense systems in bioremediation of organic pollutants. Handbook of Bioremediation – Physiological, Molecular and Biotechnological Interventions. 2021. с. 505–521.
11. Oil-Eating Bacteria: A Tool for Bioremediation. Microbewiki. 2025. с. 1. URL: [https://microbewiki.kenyon.edu/Oil-Eating\\_Bacteria](https://microbewiki.kenyon.edu/Oil-Eating_Bacteria)

12. Das N., Chandran P. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*. 2011. c. 13–17.
13. Hassanshahian M., Cappello S. Crude Oil Biodegradation in the Marine Environments. *Biodegradation – Engineering and Technology*. 2012. c. 128–132.
14. Peixoto R., Vermelho A., Rosado A. Petroleum-Degrading Enzymes: Bioremediation and New Prospects. *Enzyme Res.* 2011. c. 189–192.
15. Felux A., Franchini P., Schleheck D. Permanent draft genome sequence of sulfoquinovose-degrading *Pseudomonas putida* strain SQ1. *Standards in Genomic Sciences*. 2015. c. 1–6.
16. Al-Hawash A., Dragh M., Li S., Alhujaily A., Abbood H., Zhang X., Ma F. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 2018. c. 71–76.
17. Mirsaeidi A. The effects of nitrogen and phosphorus nutrients on the bioremediation of oil-contaminated waters by *Gracilariopsis persica* in the coastal areas of Bandar Abbas. *Marine Pollution Bulletin*. 2023. c. 212–223.
18. Cao Z., Yan W., Ding M., Yuan Y. Construction of microbial consortia for microbial degradation of complex compounds. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022. c. 13–15.
19. Zukauskaite A., Jakubauskaite V., Ambrazaitienė D., Zabukas V. The Impact of Chemical Additives on the Process of Biodegradation of Oil Products. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*. 2012. c. 17–26.
20. Abtahi H., Parhamfar M., Saeedi R., Villaseñor J., Sartaj M., Kumar M. The Effect of competition between petroleum-degrading bacteria and indigenous compost microorganisms on the efficiency of petroleum sludge bioremediation: Field application of mineral-based culture in the composting process. *Journal of Environmental Management*. 2010. c. 112–114.
21. Marigómez I. Oil, Crude. Reference Module in Biomedical Sciences – *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*. 2014. c. 663–669.

22. Dhaka A., Chattopadhyay P. A review on physical remediation techniques for treatment of marine oil spills. *Journal of Environmental Management*. 2021. с. 225–228.
23. Dewling R., McCarthy L. Chemical treatment of oil spills. *Environment International*. 1980. с. 155–162.
24. Ewald H., Ewald P. Natural Selection, The Microbiome, and Public Health. *Yale J Biol Med*. 2018. с. 445–455.
25. Nandimandalam H., Gude V. Indigenous biosensors for in situ hydrocarbon detection in aquatic environments. *Marine Pollution Bulletin*. 2019. с. 12–13.
26. Ali N., Khanafer M., Al-Awadhi H. Indigenous oil-degrading bacteria more efficient in soil bioremediation than microbial consortium and active even in super oil-saturated soils. *Frontiers in Microbiology*. 2022. с. 178–191.
27. Žvirgždas J., Paškevičius A., Petrovas S., Galginienė I., Iljasevičius K. Isolation, Selection, and Use of Oil-Degrading Microorganisms for Biological Treatment of Contaminated Soil. *Pol. J. Environ. Stud*. 2023. с. 2455–2464.
28. Hossain F., Akter A., Sohan S., Sultana N., Reza A., Hoque K. Bioremediation potential of hydrocarbon degrading bacteria: isolation, characterization, and assessment. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2021. с. 211–216.
29. Gopinathan R., Prakash M., Bharathirajan R. An experimental study for crude oil biodegradation in contaminated soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2012. с. 12–16.
30. Загальний мікробіологічний аналіз ґрунту. *Мікробіологія*. Дніпровський державний аграрно-економічний університет. Дніпро. 2018. с. 32.
31. Люта В.А., Кононов О.В. Методи мікроскопії. *Мікробіологія*. Національний медичний університет імені О. О. Богомольця. Київ. 2015. с. 7–10.
32. Красінько В.О., Волошина І.М. Морфологічні та культуральні ознаки паличкоподібних бактерій і актиноміцетів. *Біологія клітин*. Національний університет харчових технологій. Київ. 2014. с. 24–30.

33. Розчавлена крапля. Медична енциклопедія. 2014. с. 1. URL: [https://medical-enc.com.ua/razdavlennaya\\_kaplya.htm](https://medical-enc.com.ua/razdavlennaya_kaplya.htm)
34. Демченко І.Б., Семенів І.П. Інструкція щодо застосування набору реагентів для забарвлення за Грамом. Державна служба України з лікарських засобів. 2019. с. 1–4.
35. Aryal S. Gram-Positive vs Gram-Negative Bacteria – 31 Differences with Examples. Microbe Notes. 2022. с. 1. URL: <https://microbenotes.com/gram-positive-and-gram-negative-bacteria/>
36. Ілюк Н.А., Мележик О.В., Мовчан В.О., Сергійчук Н.М., Пастушенко Г.П., Корінько О.М. Методичні рекомендації для відпрацювання практичних навичок з технологічної, виробничої, переддипломної та науково-дослідної практик. Університет «Україна». Київ. 2020. с. 1–64.
37. Цитратний агар Сіммонса. Simesta. 2025. с. 1. URL: <https://simesta.com/products/tsitratnij-agar-simmons-simmons-citrate-agar-402045>
38. Глюкозо-фосфатний бульйон Кларка. Agar.ua. 2025. с. 1. URL: [https://agar.com.ua/Glucose\\_phosphatic\\_broth\\_100](https://agar.com.ua/Glucose_phosphatic_broth_100)
39. Середовище Гісса з манітом. Фармактив. 2025. с. 1. URL: <https://hlr.ua/ua/sreda-gissa-s-mannitom-farmaktiv-17816.html>
40. Ozyurek S., Bilkay I. Comparison of petroleum biodegradation efficiencies of three different bacterial consortia determined in petroleum-contaminated waste mud pit. SN Applied Sciences. 2020. с. 132–136.

**ДОДАТКИ**

Додаток А

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ****ФАКУЛЬТЕТ ЗАХИСТУ РОСЛИН, БІОТЕХНОЛОГІЙ  
І ЕКОЛОГІЇ****ЗБІРНИК**

матеріалів доповідей

**XI МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ  
КОНФЕРЕНЦІЇ СТУДЕНТІВ, АСПІРАНТІВ****І МОЛОДИХ ВЧЕНИХ****«ЕКОЛОГІЯ – ФІЛОСОФІЯ ІСНУВАННЯ  
ЛЮДСТВА»****23-24 квітня 2025 р.**

Київ – 2025

<i>Макаренко А.А., Міняйло А.А., Дмитренко Л.А.</i> <b>ЗБИТКИ ЗАВДАНІ ЗЕМЕЛЬНОМУ ФОНДУ УКРАЇНИ, ВНАСЛІДОК ВІЙСЬКОВОЇ АГРЕСІЇ РФ</b> .....	94
<i>Малишева М.В., Помін Т.О., Сербенюк Г.А.</i> <b>МІКРОПЛАСТИК У ВОДНИХ ЕКОСИСТЕМАХ: ЕКОТОКСИЧНІ ЗАГРОЗИ ТА СОЦІАЛЬНА ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ</b> .....	99
<i>Матюшко С.М.</i> <b>ЗМІНИ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ ПРОДУКТІВ ПОЛ В ТКАНИНАХ І ОРГАНАХ КОРОПА У ВІДПОВІДЬ НА ЗАБРУДНЕННЯ ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА МІКОТОКСИНОМ T2</b> .....	101
<i>Махлай К.О., Бережняк С.М.</i> <b>ОБЛІКИ ПОШКОДЖЕНИХ ДЕРЕВ, ЯК ЧИННИК РЕКРЕАЦІЙНОГО НАВАНТАЖЕННЯ РЕГІОНАЛЬНОГО ЛАНДШАФТНОГО ПАРКУ «ПАРК ПАРТИЗАНСЬКОЇ СЛАВИ»</b> .....	103
<i>Микосянчик А.М., Міняйло А.А.</i> <b>ЕКОЛОГІЧНІ ЗАСАДИ ОБЛАШТУВАННЯ ТА ФУНКЦІОНУВАННЯ ФЕРМИ З РОЗВЕДЕННЯ ОЛЕНЯ БЛАГОРОДНОГО (CERVUS ELAPHUS) В УКРАЇНІ</b> .....	104
<i>Михед Ю.А., Бондарь В.І.</i> <b>ОСОБЛИВОСТІ БІОКУМУЛЯЦІЇ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ РОСЛИНАМИ</b> .....	106
<i>Мицик В.В., Сербенюк Г.А.</i> <b>ВПЛИВ ТУРИСТИЧНОЇ ДІЯЛЬНОСТІ НА ГЕОЕКОЛОГІЧНИЙ СТАН ТЕРИТОРІЇ ПРИРОДНОГО ЗАПОВІДНИКА ГОРГАНІ</b> .....	108
<i>Монастирецька М.С., Клименко Н.В.</i> <b>МОНІТОРИНГ НАСЛІДКІВ ПІДРИВУ ДАМБИ НА Р. ІРПНЬ, СПРИЧИНЕНИХ ВНАСЛІДОК ВІЙСЬКОВОЇ ДІЯЛЬНОСТІ, В МЕЖАХ ДИМЕРСЬКОЇ ТЕРИТОРІАЛЬНОЇ ГРОМАДИ</b> .....	110
<i>Монченко М.Ю., Юрасов С.М.</i> <b>ПРОБЛЕМИ МОНІТОРИНГУ СТАНУ АТМОСФЕРНОГО ПОВІТРЯ</b> .....	112
<i>Нагорна А.А., Нестерова Н.Г.</i> <b>ДЕСТРУКЦІЯ НАФТОВИХ ВУГЛЕВОДНІВ ПРЕДСТАВНИКАМИ РОДУ PSEUDOMONAS</b> .....	115
<i>Нікітін П.С., Львіна В.Г.</i> <b>АНАЛІЗ ВПЛИВУ РІЗНИХ ВИДІВ І НОРМ ДОБРІВ НА ЯКІСНІ ТА КІЛЬКІСНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВРОЖАЮ ЯРОГО ЯЧМЕНЮ В УМОВАХ ОДЕСЬКОЇ ОБЛАСТІ</b> .....	116
<i>Наумовська О.І., Нікітченко Б.Я.</i> <b>БІОТЕСТУВАННЯ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ЗЕМЕЛЬ ЗА УМОВ ЛОКАЛЬНОГО ЗАБРУДНЕННЯ</b> .....	118
<i>Овдієнко С.В., Сербенюк Г.А.</i> <b>ВЕСНЯНО-ОСІННЯ МІГРАЦІЯ ПТАХІВ СЕЛА СЕРГІЇВКИ (ПРИЛУЦЬКИЙ РАЙОН, ЧЕРНІГІВСЬКА ОБЛАСТЬ): АНАЛІЗ ВИДОВОГО СКЛАДУ ТА ВПЛИВУ КЛІМАТИЧНИХ ЗМІН</b> .....	120

УДК 602.6:579.8:632:631.461.5

ДЕСТРУКЦІЯ НАФТОВИХ ВУГЛЕВОДНІВ ПРЕДСТАВНИКАМИ РОДУ  
*PSEUDOMONAS*

*Нагорна А.А.*, студентка 4 курсу, факультету захисту рослин, біотехнологій та екології

*Нестерова Н.Г.*, кандидат с.-г. наук, доцент кафедри фізіології, біохімії рослин та біоенергетики

*Національний університет біоресурсів і природокористування України*

Зростаюча індустріалізація та інтенсивна експлуатація нафтових ресурсів призвели до масштабного техногенного забруднення довкілля, що супроводжується надходженням нафтових вуглеводнів у ґрунтові та водні екосистеми. Особливу екологічну небезпеку становлять аліфатичні та поліциклічні ароматичні вуглеводні, які демонструють високу стійкість до природного розкладу, кумулятивну токсичність та мутагенний потенціал. Біодеструкція за участю мікроорганізмів роду *Pseudomonas*, що продукують широкий спектр оксигеназ, гідролаз та інших вторинних метаболітів, є перспективною альтернативою традиційним методам нейтралізації нафтового забруднення. Актуальність дослідження обумовлена необхідністю пошуку високоспецифічних та метаболічно активних штамів для реалізації ефективної біоремедіації на забруднених територіях [1].

Метою роботи було встановлення деструктивного потенціалу представників роду *Pseudomonas* у контексті біотрансформації та мінералізації нафтових вуглеводнів.

У ході експериментальної частини дослідження здійснено культивування мікроорганізмів-деструкторів із ґрунтових проб, відібраних з територій із різним ступенем техногенного навантаження. Для виявлення метаболічно активних ізолятів використано цільне селективне поживне середовище із додаванням нафти, бензину А-95 та дизельного пального як джерел вуглецю.

Методом серійних десятикратних розведень та подальшого інкубування за температури 25 °С протягом чотирьох тижнів було отримано колонії мікроорганізмів, ідентифікованих шляхом мікроскопії, фарбування за Грамом та проведення комплексу біохімічних тестів. За результатами морфологічних, біохімічних та культуральних характеристик встановлено належність активних ізолятів до роду *Pseudomonas*. Зокрема,

виділені представники є грамнегативними, вони продемонстрували каталазну, оксидазну активність, здатність утилізувати цитрат, а також відсутність можливості перетворювати триптофан на індол та утворювати ацетоїн (реакція Фогеса-Проскауера), що є характерним для представників *Pseudomonas spp.*

У ході дослідження для кількісної оцінки ефективності нафтоокислювальної активності мікроорганізмів роду *Pseudomonas* було застосовано метод гравіметричного аналізу, що передбачає визначення залишкової маси нафтових вуглеводнів після інкубації мікробних культур на рідкому селективному середовищі з додаванням вуглеводневої суміші [2]. За результатами вимірювань було встановлено, що маса залишкової нафтової фракції після завершення експериментального періоду зменшилась на 17% порівняно з вихідною кількістю.

Зменшення масової частки токсикантів засвідчує, що виділені із ґрунтових проб штами *Pseudomonas* мають виражений потенціал до катаболізму нафтових вуглеводнів, реалізований шляхом ферментативної активності (головним чином оксигеназ та алкангідроксилаз), що ініціюють окиснення аліфатичних і ароматичних сполук з наступною мінералізацією до екологічно безпечних метаболітів.

#### Список використаних джерел

1. Das N., Chandran P. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview – Biotechnology Research International. 2021. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3042690/>
2. Hossain F., Akter M., Sohan R. Bioremediation potential of hydrocarbon degrading bacteria: isolation, characterization, and assessment – Saudi Journal of Biological Sciences. 2022. P. 211–216. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8717088/>