

УДК 665.753.035. 5 (045)

## ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМУ БІОДЕСТРУКЦІЇ АВІАЦІЙНИХ ПАЛИВ

**О. В. Безпальчук, І. О. Шкільнюк**, керівник Випробувального центру продукції «УЦАХ СЕПРО»;  
**С. В. Бойченко**, д-р техн. наук, проф.

Національний авіаційний університет

<sup>1</sup>olja\_0809@ukr.net

*Досліджено мікроорганізми, здатні до біологічного ураження авіаційних палив. Вивчено механізм деградації нафтових вуглеводнів. Проаналізовано умови, сприятливі для росту і розмноження мікроорганізмів-деструкторів.*

**Ключові слова:** біодеградація, авіаційні палива, вуглеводні, алкани, алкени, ароматичні вуглеводні.

*The work on the study of microorganisms capable of biological destruction of aviation fuels. You are a scientist mechanism of degradation of petroleum hydrocarbons. Investigated and analyzed the conditions favorable for growth and reproduction of microorganisms-destructors.*

**Keywords:** biodegradation, aviation fuel, hydrocarbons, alkanes, alkenes, aromatic hydrocarbons.

### Вступ

Властивість мікроорганізмів засвоювати вуглеводні твердих, рідких та газоподібних нафтопродуктів стала причиною виникнення суттєвих проблем у сфері нафтодобування, нафтопереробки і нафтохімії, а особливо під час експлуатації нафтопродуктів [1]. Авіаційні палива складаються переважно з вуглеводнів — молекул, до складу яких входять лише атоми вуглецю і водню. Результати багатьох досліджень показують, що не існує вуглеводнів, які є стійкими до впливу тих чи інших мікроорганізмів [2]. На сьогодні існує 200 видів мікроорганізмів, що включають 30 родів, які здатні використовувати вуглеводні як єдине джерело вуглецю і енергії. До них належать бактерії, дріжджі та гриби.

### Постановка завдання

Об'єктом дослідження є мікроорганізми-біодеструктори авіаційних палив. Предмет дослідження — механізм біодеградації авіаційних палив.

Виходячи з актуальності даної проблеми, виділено такі завдання для виконання дослідження:

– проаналізувати видовий склад мікроорганізмів, які здатні до деградації вуглеводнів нафтового походження;

– вивчити та проаналізувати механізм деградації нафтових вуглеводнів;

– розглянути та проаналізувати умови, сприятливі для мікроорганізмів-деструкторів.

**Мета** — дослідження видового складу нафтодеструкторів, механізму біодеградації вуглеводнів нафтового походження, а також мікроорганізмів-деструкторів задля визначення наявності біологічного забруднення нафтових палив та оптимальних заходів захисту.

### Розв'язання завдання

Здатність засвоювати вуглеводні нафти і нафтопродуктів властива мікроорганізмам, які представлені різними систематичними групами. До них належать різноманітні види мікроміцетів, дріжджів і бактерій. Описано понад 20 родів бактерій і більше 10 родів грибів, здатних до біодеградації різноманітних нафтових вуглеводнів. В угруповуваннях мікроорганізмів переважають бактерії, оскільки використання вуглеводнів серед бактерій є досить поширеним явищем.

Відомо, що авіаційне паливо на 20–60 % складається з граничних вуглеводнів. До складу авіаційного бензину входять алкани з довжиною вуглецевого ланцюга переважно  $C_6$ — $C_{10}$ , до складу різних дизельних палив —  $C_{10}$ — $C_{18}$ .

Паливо ТС-1 складається на 50 % з вуглеводнів парафінового ряду, на 36,4 % і 13,6 % з ациклічних та ароматичних вуглеводнів відповідно [3].

Окиснення вуглеводнів здійснюється всередині клітин мікроорганізмів за допомогою ферментів, які індукуються субстратом. У результаті процесу біодеградації відбувається руйнування, детоксикація, утилізація і мінералізація вуглеводнів нафтопродуктів, зокрема авіаційних палив. Оскільки до складу авіаційних палив входять багато легкозасвоюваних компонентів, у процесі біодеградації паливо виступає поживним субстратом (джерелом вуглецю та енергії) для цілого ряду мікроорганізмів. Мікроорганізми-деструктори вуглеводнів представлені [5]:

1) бактеріями — *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Artrobacter*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Brevibacterium*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Desul*

*fovibrio, Enterobacter, Escherichia, Flavobacterium, Metanobacterium, Micrococcus, Micromonospora, Mycobacterium, Nicrococcus, Pseudomonas, Sarcina, Serratina, Spirillum, Vibrio, Thiobacillus;*

2) грибами (або мікроміцетами) — *Alternaria, Aspergillus, Cladosporium resinae, Cephalosporium, Penicillium;*

3) дріжджами — *Candida, Debaryomyces, Endomycopsis, Hansenula, Rhodotorula, Saccharomyces, Torula, Torulopsis, Trichoderma, Trichosporon.*

За результатами попередніх досліджень здатності росту в паливі мікроорганізмів з різних зразків авторами було виявлено ті, які є причетними до процесів деструкції вуглеводнів. До активних біодеструкторів відносяться: *Hormoconis resinae* та *Monascus floridanus*. В той час як потенційні біодеструктори — це *Alternaria alternata, Aspergillus ustus, Fusarium solani, Geotrichum candidum*.

Біодеструкція палива пов'язана з мікробіологічним ферментативним окисненням вуглеводнів з утворенням органічних кислот, що мають поверхнево-активні властивості. Підвищується вміст фактичних смол, кислотність, утворюється осад, відбувається помутніння палива, і як наслідок, з'являється специфічний запах. Відбувається забивання і пошкодження паливних фільтрів, насосів та паливних систем. Відкладення осадів міцелію і колоній бактерій на внутрішніх стінках паливних систем призводить до корозійних явищ елементів паливної системи [4].

Швидкість і глибина мікробіологічного окиснення авіаційного палива залежать від його вуглеводневого складу. Вуглеводні, які мають лінійну будову молекул, швидше руйнуються, ніж їх розгалужені ізомери. Аліфатичні вуглеводні (парафіни) менш біостійкі, ніж ароматичні. Тому і палива, які містять переважно парафінові вуглеводні, можуть руйнуватися мікроорганізмами швидше, ніж ті, які містять більшу кількість ароматичних сполук.

Від фізіологічних особливостей кожного роду мікроорганізмів залежить направленість процесу деструкції індивідуальних вуглеводнів і їх сумішей, які мають різний ступінь стійкості до окиснення. Вуглеводні можуть руйнуватися мікроорганізмами досить швидко за аеробних умов і надзвичайно повільно — за анаеробних.

Процес біодеструкції авіаційних палив відбувається шляхом активного перенесення: речовина надходить у клітину напроти градієнта концентрації в середовищі; процес потребує витрат енергії і відбувається за допомогою специфічних білків-переносників (пермеаз). Реакції мікробіологічного перетворення вуглеводнів є окиснювальними. Гранична відновлюваність цих речо-

вин робить необхідними для їх окиснення присутність кисню. Гідрофобний характер молекули є причиною того, що процеси окиснення здійснюються оксигеназами, на відміну від окиснення більш гідрофільних речовин, яке відбувається під дією дегідрогеназ. Гідрофобність вуглеводневих субстратів і їх погана розчинність у воді визначають способи транспорту речовин у клітину.

Характерною особливістю процесу асиміляції вуглеводнів як джерела вуглецю є нагромадження проміжних продуктів, яке часто трапляється в культуральному середовищі мікроорганізмів, що ростуть за рахунок таких субстратів [9].

Легкі *n*-алкани (до  $C_{16}$ ) піддаються процесу біодеструкції з більшою швидкістю, ніж ізоалкани. Парафіни можуть слугувати єдиним джерелом вуглецю та енергії для мікобактерій і спорідненим їм мікроорганізмам, декількох родів дріжджів і деяких грибів. Два фактори зумовлюють мікробіологічне окиснення парафінів: наявність складних ферментів — оксидаз змішаних функцій (оксигеназ), які здійснюють введення одного атома кисню із його молекулярної форми в кінцеву метильну групу вуглеводню, і наявність у клітині структур, які забезпечують поглинання гідрофобного і нерозчинного в воді субстрату, якими є *n*-алкани. Ферменти, які відповідають за окиснення вуглеводнів, пов'язані з мембранними структурами клітин. Алкани з розгалуженим ланцюгом вуглеводневих атомів є практично недоступними до біохімічного окиснення, що, імовірно, пов'язано з конформацією молекул субстрату і ферменту [8].

Найбільш поширений шлях окиснення *n*-алканів мікроорганізмами включає три основних етапи [7]:

1) первинне окиснення *n*-алкану, яке призводить до послідовного утворення відповідного спирту, альдегіду і монокарбонових кислот жирного ряду;

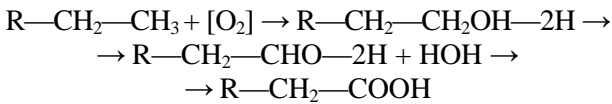
2) β-окиснення цих кислот з утворенням як основного проміжного продукту ацетил-КоА;

3) окиснення ацетату в циклі трикарбонових кислот.

На біодеструкцію аліфатичних вуглеводнів впливають не тільки їх фізико-хімічні властивості — такі як розчинність у воді, здатність до емульгування і величина поверхневого натягу, але й біологічні фактори — ферментативна активність мікроорганізмів, реакційна здатність субстрату. Крім того, варто зазначити, що біодеградація алканів може протікати по монотермінальному, дитермінальному і внутрішньотермінальному шляхам.

У переважній більшості випадків первинної ферментативної атаки молекули *n*-парафіну від-

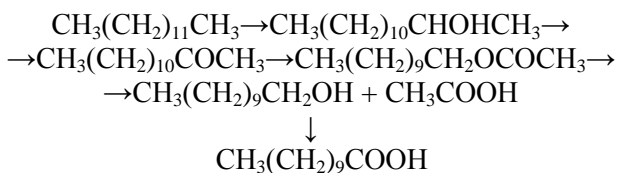
бувається окиснення термінального атома вуглеводню. Першими стабільними продуктами окиснення вуглеводнів є первинні спирти. Наступний етап складають звичайні біологічні перетворення спирту в альдегід і альдегіду в кислоту. Загальна схема реакцій виглядає так [10]:



Подальший механізм засвоєння жирних кислот, які виникають під час окиснення вуглеводнів, відбувається шляхом  $\beta$ -окиснення, який полягає в послідовному відщепленні двовуглеводневих фрагментів у вигляді активного ацетату, який надходить у цикл трикарбонових кислот.

Встановлено, що деякі мікобактерії метаболізують *n*-алкани через метилкетони з проміжним утворенням перекису і вторинного спирту. Подальше окиснення кетонів поки що недостатньо вивчено.

Деградація тридекану культурою *Pseudomonas aeruginosa* відбувається таким чином [5]:



Мікробіологічне окиснення алкенів може включати такі реакції [4]:

- окиснення метильної групи з утворенням ненасичених кислот;
- утворення епоксидів за подвійним зв'язком;
- утворення діолів.

Ненасичені вуглеводні можуть окиснюватись одночасно і за метильною групою і за подвійним зв'язком молекули. Схему реакцій окиснення алкенів бактеріями показано на рис. 1.

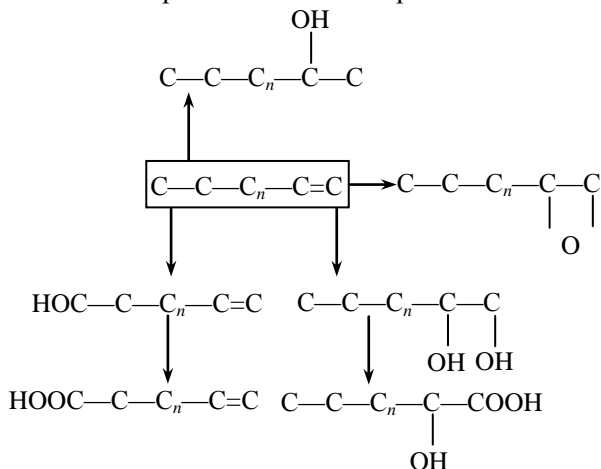


Рис. 1. Схема реакцій окиснення алкенів бактеріями

Численні дослідження щодо окиснення олефінів дріжджами і грибами також свідчать про

наявність термінального і субтермінального окиснення, в результаті чого утворюються відповідні  $\omega$ -ненасичені кислоти, насичені кислоти,  $\omega$ -ненасичені спирти, епоксиди, діоли і т. д.

Циклоалкани важче піддаються мікробіологічному розкладанню порівняно з алканами, що пов'язано з наявністю циклічної структури, яка важче окиснюється. До штамів, які здатні до біодеградації циклічних алканів, відносяться бактерії родів *Cordia*, *Xanthobacter* та ін. Штами, здатні до біодеструкції циклоалканів, мають специфічні ферментні системи, які відрізняються від ферментних систем, що використовуються мікроорганізмами для окиснення нециклічних алканів.

Деградація циклоалканів нерідко передують їм ароматизації. *Micobacterium vaccae*, який здатний засвоювати ізоалкани, зокрема 2-метилбутан, окиснює циклічні алкани до відповідних кетонів суспензіями відмитих клітин. На рис. 2 і 3 наведено типові приклади окиснювальних трансформацій циклоалканів [8].

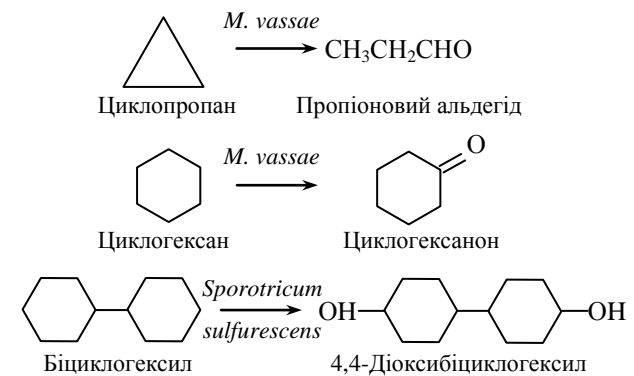


Рис. 2. Схема реакцій окиснення циклопропану

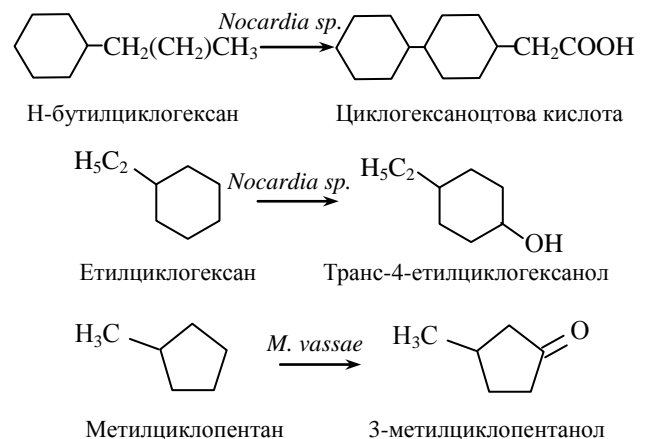


Рис. 3. Схема реакцій окиснення *n*-бутилциклогексану, етилциклогексану і метилциклопентану

Бактеріальна деградація моноциклічних ароматичних вуглеводнів починається або з атаки монооксигенази або діоксигенази на ароматичне кільце, або з окиснення метильної групи з наступ-

ною атакою ароматичного кільця. Гідроксильовані ароматичні вуглеводні піддаються розщепленню з розривом ароматичного кільця, утворюючи карбоксильовані сполуки, які за наявності в штамі ферментів подальшого окиснення, можуть деградувати до інтермедіатів циклу Кребса [9].

Деградація толуолу штамом *P.putida* здійснюється шляхом перетворення метальної групи в карбоксильну, і далі отримані метаболіти перетворюються в інтермедіати циклу Кребса з розщепленням кахетолу за мета-шляхом.

Великий деструктивний (катаболітичний) потенціал відносно до ароматичних вуглеводнів мають бактерії роду *Pseudomonas*. Вони здатні повністю розщеплювати або частково трансформувати такі сполуки, як нафталін, фенатрен, флуорен та ін.

Відомі шляхи мікробної деградації мета- і параксилілів, в яких окиснення здійснюється шляхом перетворення метальної групи в карбоксильну групу і далі отримані метаболіти перетворюються в інтермедіати циклу Кребса з розщепленням кахетолу за мета-шляхом.

Дотепер відомі загальні принципи метаболізму поліциклічних ароматичних вуглеводнів (ПАВ) [6]:

1. Зазвичай швидкість деградації поліциклічних ароматичних вуглеводнів обернено пропорційна кількості кілець у молекулі ПАВ. Це пов'язано з їх низькою водною розчинністю, яка

знижується зі збільшенням кількості ароматичних кілець. Так, розчинність нафталіну у воді за температури 25 °С становить 34 мг/л, фенатрену — 1,3 мг/л, однак навіть за низьких концентрацій він здатний підлягати мікробіологічній деструкції.

2. Механізми біодеградації вуглеводнів аеробними мікроорганізмами потребують присутності кисню, який ініціює ферментативну атаку кілець ПАВ [7]. Але деякі ферментативні системи, наприклад метан монооксидази і лігнін пероксидази, беруть участь в анаеробному розкладанні ПАВ.

3. На мікробіологічну деструкцію ПАВ впливають такі фактори, як температура, рН-середовища, доступність кисню і води, швидкість дифузії, мікробіологічна адаптація, біодоступність, концентрація, фізичні та хімічні властивості ПАВ.

Бактеріальна деградація поліциклічних ароматичних вуглеводнів, у першу чергу, відбувається через монооксигеназну або діоксигеназну атаку ароматичного кільця. Дегідроксильовані ПАВ, що формуються, піддаються розщепленню з розривом ароматичного кільця, утворюючи карбоксильовані сполуки, які, за наявності в штамі ферментів подальшого окиснення, можуть утилізуватися до інтермедіатів циклу Кребса [2].

У первинній атаці поліциклічних ароматичних вуглеводнів беруть участь ферменти з широкою субстральною специфічністю, наприклад, ферменти біодеградації нафталіну (рис. 4).

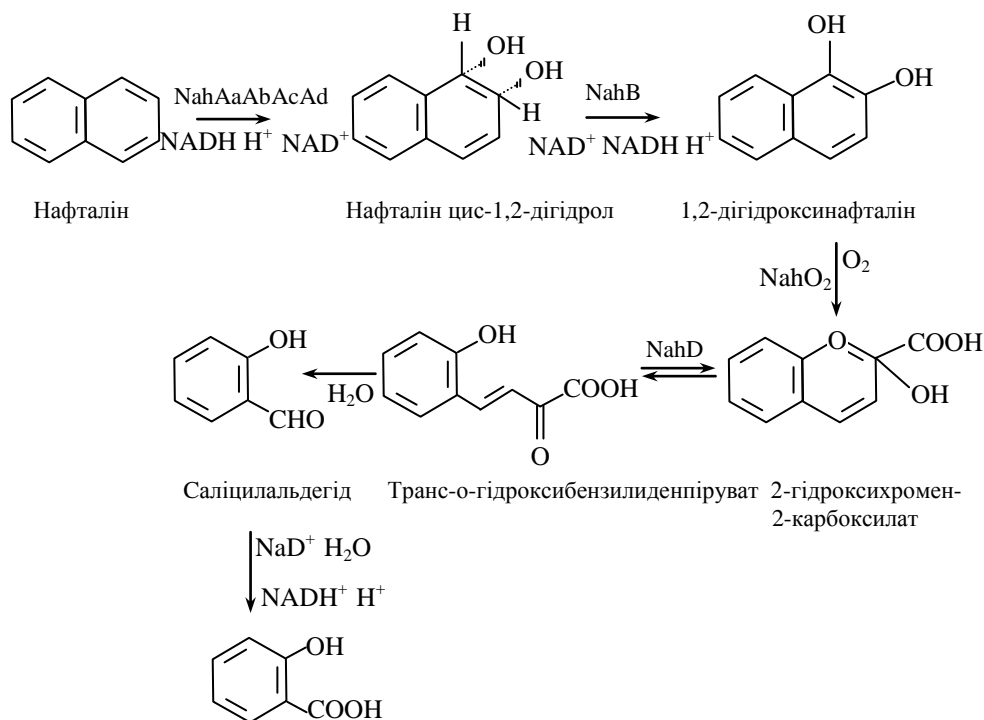


Рис. 3. Біохімічні шляхи біодеградації вуглеводню на прикладі нафталіну, гени і кодувальні ними ферменти:

NahAaAbAcAd — нафталін 1,2-діоксигеназа; NahB — нафталін цис-дігідрол дегідрогеназа;  
 NahC — 1,2-дігідроксинафталін діоксигеназа; NahD — 2-гідроксикромен-2-карбоксилат ізомераза;  
 NahE — 2-гідроксикеніл піруват альдозаза; NahF — салицилальдегід дегідрогеназа

Відомо чотири можливих шляхи катаболізму нафталіну аеробними бактеріями [7]:

1) неповне окиснення нафталіну до саліцилової кислоти, зі звільненням пірувату і накопиченням саліцилової кислоти в ростовому середовищі;

2) повний катаболізм нафталіну з використанням мета-шляху розщеплення кахетолу;

3) повний катаболізм нафталіну з використанням ортошляху розщеплення кахетолу;

4) повний катаболізм нафталіну через гентинову кислоту.

Було проведено оцінювання активності росту в паливі активних і потенційних деструкторів за значенням накопичення біомаси після місяця вирощування.

Найбільшу масу міцелію було відзначено для всіх штамів *H. resiniae* та штаму *M. floridanus*. Найбільше значення біомаси відзначено для штаму *H. resiniae*, виділеного з бака літака, воно становило 0,4084 г/100 мл.

Серед п'яти штамів другої групи найбільше значення біомаси відзначено для штаму *A. ustus* — 0,1 г/100 мл, найменше для *G. Candidum* — 0,05 г/100 мл. Різниця у масі міцелію між двома штамами *F. Solani*, виділеними з двох різних експериментальних майданчиків, виявилася несуттєвою — 0017 г/100 мл (за стандартного відхилення  $\pm 0,01$ ).

Далі було вивчено здатність росту активних і потенційних деструкторів на різних вуглеводнях нафти, що входять до складу палив. Мікроміцети ростуть на всіх випробуваних рідких вуглеводнях, крім гексану.

Для *H. resiniae* і *M. floridanus* було відзначено тенденцію до зростання на вуглеводнях з більш довгими вуглецевими ланцюгами ( $C_{10}$ — $C_{17}$ ). Найбільше значення приросту біомаси у *H. resiniae* відзначено на гептадекані ( $C_{17}H_{36}$ ), *M. floridanus* на гексадекані ( $C_{16}H_{34}$ ) (рис. 4).

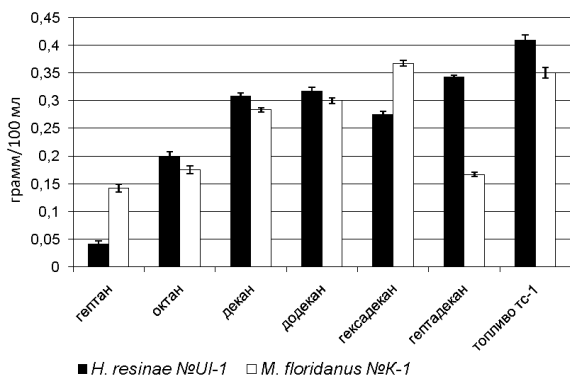


Рис. 4. Біомаса активних деструкторів після місяця зростання на вуглеводнях ( $\pm$  стандартне відхилення,  $n = 5$ ).

Накопичення біомаси при зростанні на даних вуглеводнях наближається до значення під час зростання в авіаційному паливі. Все це свідчить про те, що штами *H. Resinae* і *M. floridanus* здатні пошкоджувати й інші авіаційні дизельні палива, які містять у своїй основі вуглеводні з довжиною вуглецевого ланцюга  $C_{10}$ — $C_{17}$ .

Мікроміцети другої групи ростуть на граничних вуглеводнях приблизно з тією самою активністю, що й в авіаційному паливі. Виняток становить штам *F. Solani*, для якого відзначено найбільш активне зростання на випробуваних вуглеводнях серед мікроміцетів другої групи (рис. 5), особливо на вуглеводнях з більш коротким вуглецевим ланцюгом ( $C_7$ — $C_{10}$ ) на відміну від мікроміцетів з першої групи. Накопичення біомаси даного штаму при зростанні на октані в три рази перевищує це значення при зростанні в паливі. Такі штами, як *F. Solani* можуть бути причиною біопшкоджень різних бензинів, що містять вуглеводні з довжиною ланцюга  $C_7$ — $C_{10}$ .

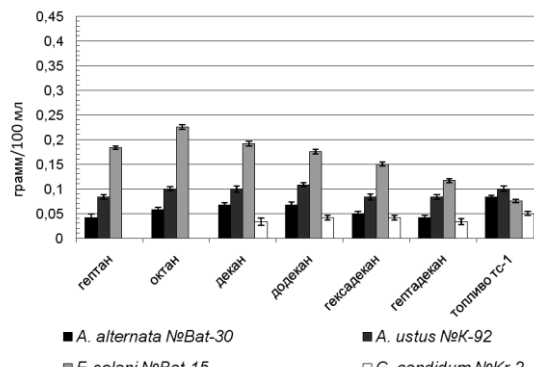


Рис. 5. Біомаса потенційних деструкторів після місяця зростання на вуглеводнях ( $\pm$  стандартне відхилення,  $n = 5$ ).

## Висновки

Отже, біодеструкція нафтових вуглеводнів відбувається двома шляхами — за допомогою аеробного та анаеробного окиснення. Ці процеси не протікають окремо, а є взаємопов'язаним процесом симбіозу мікроорганізмів-нафтодеструкторів. Аеробна деструкція здійснюється за допомогою вуглеводневоокиснювальних бактерій, в той час як механізм анаеробного розщеплення вуглеводнів досі повністю не вивчений.

Біодеструктивну дію мікроскопічні гриби здійснюють двома шляхами — механічним (завдяки здатності механічно руйнувати матеріали міцелієм, що розростається, наявності апікального росту грибних гіфів, проростання гіфів міцелію в товщу матеріалу) та «біохімічним», переважно внаслідок дії екзометаболітів (органічних кислот, ферментів, пігментів).

Через зазначені особливості мікроміцети визнані головними агентами біопшкоджень у на-

земному середовищі. Вони можуть пошкоджувати і руйнувати багато різноманітних виробів та матеріалів, створених людиною. Але найбільшого ураження зазнають саме авіаційні палива.

Руйнування вуглеводнів під дією мікроміцетів посилюється, якщо цьому сприяють умови навколишнього середовища (відносна вологість повітря, температура, світло тощо).

### ЛІТЕРАТУРА

1. *Бойченко С. В.* Забезпечення біологічної стабільності вуглеводневих палив / С. В. Бойченко, Н. М. Кучма // Вісник НАУ. — 2004. — № 4. — С. 161–164.

2. *Квасников Е. И.* Микроорганизмы-деструкторы нефти в водных бассейнах / Е. И. Квасников, Т. М. Ключникова. — К. : Наук. думка, 1981. — 528 с.

3. *Биодеградация* нефтепродуктов штаммами-деструкторами и их ассоциациями в жидкой среде / Л. М. Барышникова, В. Г. Грищенко, М. У. Аринбасаров [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология, 2001. — Т. 37. — С. 542–548.

4. *Логинов О. Н.* Биотехнологические методы очистки окружающей среды от технологических загрязнений / О. Н. Логинов, Н. Н. Силищев,

Т. Ф. Бойко, Н. Ф. Галимзянова. — Уфа : Гос. изд. науч.-техн. лит. Реактив, 2000. — 100 с.

5. *Новосёлова Е. И.* Структурно-функциональная трансформация биогеоценоза при нефтяном загрязнении и пути его восстановления: монография / Е. И. Новосёлова. — Уфа : РИО БашГУ, 2004. — 126 с.

6. *Коронелли Т. В.* Поступление углеводов в клетки микроорганизмов / Т. В. Коронелли // Успехи микробиологии. — 1980. — Вып. 15. — С. 99–111.

7. *Коронелли Т. В.* Микробиологическая деградация углеводов и её экологические последствия / Т. В. Коронелли // Биологические науки, 1982. — № 3. — С. 5–12.

8. *Козлова И. П.* Геохимическая деятельность микроорганизмов та її прикладні аспекти / И. П. Козлова, О. С. Радченко, Л. Г. Степура, Т. О. Кондратюк. — К. : Наук. думка, 2008. — 528 с.

9. *Патика В. П.* Экология микроорганизмов / В. П. Патика, Т. Г. Омелянец, И. В. Гриник, В. Ф. Петриченко. — К. : Основа, 2007. — 192 с.

10. *Поражаемость* нефтяных дистиллятных топлив микроорганизмами и их защита / Н. С. Егоров, Т. П. Вишнякова, Н. Н. Гречушкина [и др.] // Микроорганизмы низшие растения — разрушители материалов и изделий. — М. : Наука, 1979. — 256 с.

Стаття надійшла до редакції 30.01.13.