

Всеукраїнський конкурс  
студентських наукових робіт  
з галузей знань і спеціальностей  
Хімічні технології та інженерія

НАУКОВА РОБОТА  
на тему «Вплив мікробіологічного забруднення  
на властивості моторних палив»

Шифр «Біоцидна добавка»

## АНОТАЦІЯ

до наукової роботи під шифром «Біоцидна добавка»

**Актуальність.** Проблема мікробіологічного ураження палива та матеріалів паливних систем, які експлуатуються в різноманітних кліматичних зонах, особливо в районах з вологим кліматом, є актуальною, оскільки життєдіяльність мікроорганізмів прискорює розкладання палива та корозію матеріалів. На даний момент питання визначення та пригнічення - мікробіологічного забруднення традиційних та альтернативних видів палива вивчені недостатньо.

**Мета дослідження** – розробити методику для визначення ступеня мікробіологічного забруднення палив, що вміщують метилові естери жирних кислот, дати оцінку його морфологічних - культуральних характеристик та запропонувати добавку для його зменшення.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні завдання: розробити удосконалену методику визначення наявності мікробіологічного ураження сумішевого дизельного палива і кількісне визначення його ступеня; виділити та ідентифікувати мікроорганізми, що знаходяться в паливі, виділити активні деструктори палив та конструкційних матеріалів, запропонувати біоцидну присадку та перевірити її ефективність.

**Структура та об'єм роботи.** Наукова робота складається зі вступу, 8 розділів, висновків, списку використаних джерел. Повний обсяг роботи 32 сторінки: 9 рисунків за текстом, 4 таблиці за текстом, 13 найменувань використаних літературних джерел.

**Ключові слова:** метилові естери жирних кислот, біозабруднення, біоцидна добавка, сумішеве дизельне паливо, мікробіологічна стабільність.

**Ступінь самостійності роботи.** Робота виконана з достатнім рівнем самостійності.

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	4
1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД .....	6
2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА .....	13
3 СТЕРИЛІЗАЦІЯ .....	14
4 БАЗОВІ ПРИГОТУВАННЯ .....	14
5 ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ БІОЛОГІЧНОГО ЗАБРУДНЕННЯ.....	15
6 ІДЕНТИФІКАЦІЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО ЗАБРУДНЕННЯ .....	16
7 ВПЛИВ БІОЦИДНОЇ ПРИСАДКИ НА СТУПЕНЬ БІОЛОГІЧНОГО ЗАБРУДНЕННЯ .....	17
8 РЕЗУЛЬТАТИ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	18
8.1 РЕЗУЛЬТАТИ ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО ЗАБРУДНЕННЯ .....	18
8.2 РЕЗУЛЬТАТИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО ЗАБРУДНЕННЯ .....	22
ВИСНОВКИ.....	30
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	31

## ВСТУП

Зростаюче забруднення навколишнього середовища, погіршення екологічної обстановки, зменшення запасів нафти в усьому світі привели вчених до пошуку альтернативних видів палива, які одержують з відновлювальних джерел. В даний час інтенсивно використовується паливо, основу якого складають метилові ефіри жирних кислот (МЕЖК). МЕЖК можуть додаватися в будь-якій концентрації до традиційного пального, або повністю замінити його, оскільки мають схожі експлуатаційні властивості.

Навколо виробництва палива на основі МЕЖК розгорається все більше суперечок. Однією з його основних переваг є екологічність, яка полягає в зниженні концентрації шкідливих речовин, що викидаються з відпрацьованими газами і його кращою, в порівнянні з мінеральним дизельним паливом, біорозкладністю.

Біорозкладність МЕЖК є перевагою в контексті біоремедіації, але є недоліком для контролю якості палива. Мінералізація МЕЖК в 2-4 рази вище, ніж у нафтового дизельного палива. Довжина ланцюга жирних кислот, число і положення подвійних зв'язків  $C=C$ , а також наявність антиоксидантних сполук вносять вклад в окислювальну здатність та біологічну стійкість МЕЖК. Чим більше концентрація насичених жирних кислот, тим більше окислювальна стабільність.

При добавці МЕЖК до нафтового дизельного палива швидкість і повнота розкладання нафтового дизельного палива збільшується в декілька разів, оскільки мікроорганізми використовують жирні кислоти як джерело енергії [1].

Існує ряд проблем з використанням МЕЖК, які необхідно вирішити, перш ніж МЕЖК стануть цілком життєздатною альтернативою викопному паливу.

МЕЖК та мінеральне дизельне паливо мають схожу теплотворну здатність, в'язкість та густину, однак, більш схильні до мікробіологічного забруднення. МЕЖК відрізняються більш високою швидкістю деградації,

спричинену мікроорганізмами, та вищою швидкістю мікробіологічної корозії компонентів паливної системи.

Проблема мікробіологічного ураження палива та матеріалів паливних систем, які експлуатуються в різноманітних кліматичних зонах, особливо в районах з вологим кліматом, є актуальною, оскільки на долю бактерій та грибів приходить більше половини всіх біологічних уражень. Гриби знаходяться в ґрунті, воді, повітрі, на різних поверхнях.

Статистика свідчить, що значна частина всіх корозійних пошкоджень матеріалів та технічного обладнання викликаються процесами за участю мікроорганізмів, які виділяють продукти метаболізму ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{SO}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}_5$  та ін.) та прискорюють корозію [2].

В наш час складно знайти групу матеріалів, на котру б мікроорганізми не завдавали руйнівного впливу, крім того, безконтрольний розвиток мікроорганізмів на матеріалах шкідливий для здоров'я людини. Бактерії та гриби можуть бути причиною алергій, шкірних захворювань та проблем з диханням.

Мікробіологічне ураження ділиться на два типи. Перший тип обумовлює оборотні зміни властивостей. Після видалення мікробіологічних відкладів всі виявлені зміни показників матеріалу відновлюються до вихідних значень.

До другого типу відносяться мікробіологічні ураження, що призводять до незворотних змін властивостей (зниження міцності гум, руйнування лакофарбових покриттів, дефектів металів і сплавів, зміни фізичних показників паливно-мастильних матеріалів та олив) [3].

В результаті розвитку мікроорганізмів виникають наступні проблеми:

- скупчення шламу в донній частині паливного баку;
- погіршення кондиційності палива та утворення стійких водних емульсій;

- підвищення кислотності, зміна фізико-хімічних властивостей палива (збільшення кінематичної в'язкості, показника заломлення, рН, вміст фактичних смол і т.і.), поява осаду, каламутності та різкого запаху [2];
- відкладення осаду на внутрішніх стінках паливних систем;
- руйнування захисних покриттів під скупченням колоній мікроорганізмів;
- ураження лакофарбових матеріалів (набухання, руйнування, погіршення адгезії) та виробів з еластомерів ;
- колонії мікроскопічних грибів на гумі і герметиках інтенсифікують конденсацію водяної пари, погіршують механічні та діелектричні властивості цих матеріалів [4];
- виникнення та розвиток корозійних процесів на деталях оливних чи гідравлічних систем;
- підвищення сили тертя та знос в шарнірах, підшипниках та ін.;
- корозія силових елементів конструкції (силові балки);
- підвищений знос двигуна;

Відклади, які виникають в процесі життєдіяльності мікроорганізмів, забруднення матеріалів, зміна їх властивостей обумовлює необхідність збільшення витрат на технічне обслуговування приладу (очищення, ремонт, заміна деталей та ін.).

Витрати на технічне обслуговування та експлуатацію автомобілів можна істотно зменшити шляхом контролю мікробіологічного забруднення до виникнення проблем.

## 1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

На сьогоднішній день відомо 200 видів мікроорганізмів, в тому числі 30 сімейств, які можуть використовувати вуглеводні палива в якості єдиного джерела вуглецю і енергії. На ріст та розвиток мікроорганізмів впливає цілий ряд факторів, серед яких найбільш ваговими є температура та вологість.

Оптимальна температура для розвитку більшості цвілевих грибів та бактерій 25–35°C. Крім цього, чим вище в навколишньому середовищі вміст вологи, тим активніше ростуть мікроорганізми [5].

Видовий склад та властивості штамів (агресивність до матеріалу) розрізняються залежно від матеріалу, конструктивно-технологічних особливостей деталей паливної системи та кліматичного району експлуатації виробу.

Гриби родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Alternaria* та бактерії роду *Bacillus* здатні руйнувати різноманітні матеріали. В той же час багато мікроорганізмів мають деструктивну здатність лише по відношенню до деяких матеріалів.

Основними мікроорганізмами, що викликають біоураження палив, є бактерії родів *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, а також гриби *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* та ін. При цьому частіше за інших в нафтопродуктах виявляють бактерію *Ps aeruginosa* та гриби *Cladosporium Resinae* («гасовий гриб»).

Більше половини усіх випадків мікробіологічного руйнування олив та мастил відбувається в результаті дії грибів роду *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Scopulariopsis*. Мікробіологічне ураження полімерних та лакофарбових матеріалів є наслідком діяльності грибів роду *Penicillium*, *Stemphylium*, *Chaetomium*, *Trichoderma* [2].

«Гасовий гриб» розмножується спорами, які можуть знаходитися в пасивному стані досить довго, очікуючи сприятливих умов для росту. Оскільки розмір спор менший за розмір пор паливних фільтрів, фільтрацією неможливо очистити паливо. Гасовий гриб росте волокнами, які можуть досягати значної довжини та утворювати звивистий шар – міцелій. У порівнянні з іншими грибами *Cladosporium Resinae* виробляє набагато більше біомаси і таким чином має значно вищу ймовірність спричинити технічні несправності в паливній системі.

Оскільки даний гриб росте на межі фаз «паливо-вода», для росту йому достатньо всього краплі вологи. Потім міцелій починає покривати краплю, утримуючи її на місці, та продовжує свій ріст, виробляючи при цьому ще більше води завдяки своєму метаболізму. У процесі росту він може міцно прикріпитися до паливного баку [3].

Всі мікроорганізми можна розділити на три групи: активні деструктори (мікроорганізми, які активно ростуть в паливі), потенційні деструктори (штами з середньою активністю росту) та частково адаптовані до середовища чи випадкові мікроміцети (штами, які практично не ростуть в паливі, тобто не використовують вуглеводні в якості джерела енергії) [1].

Доведено, що біологічне забруднення палива відбувається внаслідок мікробного ферментативного окислення вуглеводнів з утворенням органічних кислот, що володіють поверхнево-активними властивостями. Швидкість і глибина мікробного окислення палива залежать від його вуглеводневого складу. Вуглеводні з лінійною структурою молекул руйнуються швидше, ніж їх розгалужені ізомери. Аліфатичні вуглеводні менш біостабільності, ніж ароматичні [5].

Бактерії та спори грибів переносяться по повітрю, прикріплюючись до частинок пилу чи крапель води. Ступінь зараженості повітря залежить від сезону. Загальна кількість грибів улітку більша, ніж взимку. Повітряне середовище є постійним та універсальним джерелом мікробіологічного забруднення.

Паливо заражається при транспортуванні та ручній очистці паливних систем, тому спори можуть залишатися непомітними впродовж значного періоду часу, чекаючи на потрібні умови.

В процесі експлуатації паливо змішується одночасно з мікроміцетами та бактеріями, але наявність мікроміцетів, які являються домінуючими деструкторами, маскується бактеріями, які розвиваються більш активно.



МЕЖК більш схильні до мікробіологічного забруднення через кілька факторів, основним з яких є гігроскопічність. Наявність води у залишкових кількостях обумовлена стійкістю емульсії, яка утворилася після процесу переетерифікації. Іншим фактором є вища, ніж у традиційного дизельного палива біодоступність МЕЖК. Біопаливо легко гідролізується до жирних кислот, як хімічними, так і мікробними реакціями.

В ході досліджень за швидкістю насичення вологою МЕЖК було встановлено, що за перші 96 годин експерименту відбувається інтенсивне насичення МЕЖК вологою (більше 2 мг води / г МЕЖК) [1].

Основні джерела потрапляння води в паливо:

- атмосферна волога з повітря;
- дощ або сніг, які можуть потрапити в паливний бак через отвори для відбору проб, вентиляційні клапани чи нещільно закрити кришку;
- вода, яка накопичується на дні резервуарів.

Реакція мікроорганізмів, які розвиваються в паливі, на різкі перепади температури може бути різноманітною та залежить від їх фізіологічних властивостей. «Гасовий гриб» залишається життєздатним за температури мінус 30°C. Границя позитивних температур становить 50 °C, при цій температурі припиняється зростання колоній, а при 60 °C гинуть і спори. Мікроміцети здатні відновлювати вегетативний ріст після механічного руйнування міцелія на окремі фрагменти, що приводить до їх розповсюдження по паливній системі [6].

Для запобігання виникнення мікробіологічного забруднення розробляється низка спеціальних експлуатаційних заходів:

1. підтримання правильних умов зберігання палива;
2. своєчасний та повний злив відстою з паливних баків, визначення наявності та характеру забруднень;
3. запобігання контакту з водою і атмосферною вологою;

4. своєчасне осушування палива та видалення води з донної частини резервуарів та паливних баків;
5. застосування біоцидних присадок;
6. використання на складах такого порядку фільтрації, який забезпечує необхідну ступінь чистоти палива, згідно нормативним документам;
7. регулярна перевірка стану фільтрів для визначення наявності та природи забруднень на фільтруючих елементах та їх якісна очистка (промивка);
8. своєчасне очищення технологічного обладнання при зберіганні палива;
9. дезинфекція паливних баків за допомогою хімічних речовин, які мають дезинфікуючі властивості (гіпохлорит натрію, хлоргексидин, розчини органічних сполук);
10. термічна обробка – продувка паливної системи гарячим повітрям (у відсутності палива), нагрітим до температури 70 ° C;
11. введення в матеріали паливних систем антисептиків з метою забезпечення стійкості до впливу мікроорганізмів (феноли, четвертинні амонійні сполуки, похідні оксіфеноляту);
12. обробка УФ випроміненням за допомогою спеціальних ламп.

Біоцидні присадки являють собою хімічні сполуки, які здатні вбивати мікроорганізми, чи пригнічувати їх розмноження, не допускаючи деградацію палива. В наш час ведуться активні роботи по розробці біоцидних присадок до палива. Основна складність при використанні біоцидів – токсичність та небезпека для здоров'я людини.

В результаті процесів адаптації до нових субстратів в паливі можуть з'являтися нові види мікроорганізмів. Мікроміцети здатні не тільки витримувати вплив багатьох біоцидів, але й почати активніше виробляти біомасу. Якщо гриби вижили в середовищі з біоцидом та почали рости, то подальший розвиток відбувається незалежно від концентрації біоциду. Це пояснюється не тільки адаптацією, але й тим, що оболонка навколо міцелія

здатна вибірково перешкоджати проникненню до вегетативних клітин окремих речовин та/чи адсорбувати біоциди та нейтралізувати їх вплив. Тому важливо постійно досліджувати мікроміцети, які уражають паливо та паливні матеріали.

Підбір біоцидної присадки - це складна, багатоцільова задача. Присадка повинна бути термостійкою, нетоксичною, максимально універсальною по відношенню до різноманітних мікроорганізмів, не повинна впливати на фізико-хімічні властивості палива.

Однією з задач даного дослідження був підбір біоцидної присадки для захисту вуглеводневого палива від мікробіологічного ураження., яка забезпечує високу ефективність пригнічення росту мікроорганізмів та зберігає фізико-хімічні та експлуатаційні властивості палива при тривалому зберіганні.

В якості основної міри запобігання для всіх паливних баків використовується регулярний злив відстію. При підозрі на наявність мікробіологічного забруднення паливо слід протестувати.

Метод визначення мікробіологічного ураження моторного палива вимагає виявлення активних культур мікроорганізмів і умов дослідження, а також надійного і швидкого способу виявлення мікроорганізмів.

До методів визначення мікробіологічного забруднення відносяться:

- Метод безпосереднього підрахунку кількості клітин під мікроскопом. Даний метод використовується рідко через наявність емульсії та нерівномірності розподілу клітин в паливі. Неможливо виділити життєздатні клітини серед мертвих.

- Метод підрахунку мікроорганізмів на фіксованих забарвлених мазках по Граму. Недоліками цього методу є нерівномірність розподілу емульсії по предметному скельцю та складність приготувати препарат строго відомої площі.

- Метод визначення наявності мікроорганізмів по зміні певних показників палива (рН водної фази, кислотності, вмісту сульфідів, компонентного складу, вмісту металів, зміни температури спалаху). Даний

метод дає неточну інформацію через непряме визначення наявності мікроорганізмів.

– Індикаторний метод. Прямий аналіз палива з використанням індикаторів: нінгідрину (зміна забарвлення від синього кольору до рожевого), або хлористого трифенілтетразолію (зміна забарвлення від червоного до коричневого). Окремо виділяють метод Лоурі: розчин забарвлюється в блакитний колір в результаті взаємодії білків, які виробляють мікроорганізми, з реагентом Фоліна. Даний метод дає лише якісну інформацію про біологічне забруднення.

– Гравіметричний метод. Міцелій грибів відділяється на фільтрах під вакуумом. Отриману біомасу промивають, просушують та доводять до постійної ваги. Метод дає точний результат тільки при наявності мікробіологічного забруднення, яке можна побачити неозброєним оком.

– Метод центрифуги. Базується на центрифугуванні зразків зараженого палива, які були попередньо гомогенізовані. Зчитується довжина певних шарів у пробірці з калібрувального графіка.

– Метод визначення по наявності продуктів метаболізму мікроорганізмів: білкових сполук (визначаються ІЧ методом), карбонових кислот (хроматографія), вітаміну В<sub>6</sub> (спектрофлуоресцентний метод), ферментів (біохімічний метод);

– Люмінесцентний метод. При опромінюванні УФ-світлом мікроорганізмів, які попередньо підфарбували флуорохромом, можна спостерігати зелене світіння.

В даний час проводяться розробки експрес методів, які значно зменшують час на проведення даного випробування [5].

В роботі розроблено удосконалену методику кількісного підрахунку колоній мікроорганізмів у паливі, засновану на поєднанні мікробіологічного та гравіметричного методів.

Використання паперових фільтрів дозволяє підвищити точність мікроскопічного дослідження, уникнувши похибки через нерівномірність розподілу клітин у паливі, в свою чергу, використання висіву зразків палива на чашках Петрі дозволяє виявляти колонії мікроорганізмів, наявні на фільтрі, у концентраціях, які не можуть бути визначені гравіметрично.

Таким чином, виходячи з аналізу літератури за тематикою дослідження, наразі питання ступеня мікробіологічного ураження традиційних та альтернативних палив починає активно розвиватися, але методики для кількісної оцінки мікроорганізмів не існує. На даний час використовуються індикаторні способи визначення мікробіологічного забруднення, але дані методи дають тільки якісну оцінку, а не кількісну, що не дає в повній мірі визначити ступінь мікробіологічного зараження палива [5].

## 2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Для проведення мікробіологічних досліджень використані наступні реактиви: спирт, пептон ферментативний, глюкоза 5%, агар мікробіологічний, натрію цитрат, дріжджі, соляна кислота 1 моль/л, їдкий натр 10%.

В даному дослідженні використовувалося наступне обладнання:

- скляні мірні циліндри номінальною місткістю 100, 400 та 1000 мл. та скляні кришки відповідного розміру;
- скляні пляшки номінальною ємністю 1000 мл;
- стерильні скляні піпетки номінальною ємністю 1 та 2 мл з градуванням 0,1 мл;
- стерильні пластикові наконечники;
- паперові стерильні фільтри «Синя стрічка» з розміром пор 3-5 мкм.;
- щіпці з тупими наконечниками;
- термостат, здатний підтримувати температуру  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ;
- спиртовий пальник;
- сушильна шафа, здатна підтримувати температуру  $180^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ;

- лабораторний мікроскоп «Біолам» С-11
- скляні шпателі;
- алюмінієва фольга;
- стерильна вата;
- паперові стікери та маркер;
- пергаментний папір.

Експериментальна частина дослідження включала в себе наступні етапи:

- Стерилізація.
- Базові приготування.
- Визначення ступеня біологічного забруднення.
- Визначення впливу біоцидної присадки на ступень забруднення.
- 

### 3 СТЕРИЛІЗАЦІЯ

Скляний посуд обертали в пергаментний папір, отвори піпеток закривали ватними пробками, паперові фільтри загорталася в конверти з пергаментного паперу поштучно, після чого поміщалися в сушильну шафу та витримувалися протягом 2 годин при температурі  $180\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Металеві інструменти поміщали в стакан зі спиртом так, щоб робочі кінці були повністю занурені.

Поживне середовище доводили до температури  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  та витримували при цій температурі 10 хв. За цей час всі вегетативні клітини гинуть, життєздатними залишаються тільки спори. Потім середовище охолоджували до температури, яка оптимальна для проростання спор, ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) та через декілька годин знову нагрівали до  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Даний цикл повторювали тричі [7].

### 4 БАЗОВІ ПРИГОТУВАННЯ

Паливо залишалася у спокої на 1 годину, після чого оглядалося візуально на наявність видимих механічних домішок чи вільної води. В разі наявності у

зразку стороннього забруднення, паливо піддавали очищенню, після чого ретельно переміщували для рівномірності розподілу мікроорганізмів.

## 5 ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ БІОЛОГІЧНОГО ЗАБРУДНЕННЯ

Для приготування середовища суспендували 60г глюкозо-пептоного агару в 1 літрі дистильованої води та нагрівали до повного розчинення. Середовище наливали в стерильну чашку Петрі та після повного застигання перевіряли за допомогою рН-метру. Якщо показник рН знаходиться за межами діапазону  $5,4 \pm 0,2$ , оптимального для гарного росту більшості бактерій та грибів, його регулювали, використовуючи соляну кислоту або гідроксид натрію. Після приготування середовище переливали в стерильні скляні пляшки та стерилізували.

В стерильні чашки Петрі наливали розплавлене на киплячій водяній бані агаризоване середовище, по 20 мл у кожену. Для запобігання утворення конденсату чашки залишали на горизонтальній поверхні до повного застигання, потім витримували 3 доби при  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  кришками вниз для підсихання поверхні середовища і перевірки її стерильності. На чашки наклеювали паперові етикетки з датою та номером посіву.

Ступінь мікробіологічного забруднення був встановлений для зразків МЕЖК з соняшнику і ріпаку, а також дизельного палива. Для кожного виду палива були проведені три посіви об'ємами 0.15, 0.20 і 0.24 мл.

Дані об'єми були вибрані серією посівів з метою знаходження оптимальної кількості колоній в чашці (не більше 300 колоній) [8].

Відомий об'єм попередньо перемішаного палива стерильною піпеткою поміщався на поверхню агаризованого середовища в чашці Петрі і розподілявся по її поверхні стерильним шпателем. Перемішане паливо розподілялося по поверхні середовища круговими рухами, одночасно з обертанням чашки. Скляні та металеві інструменти занурювалися в спирт та проводилися над спиртовим пальником до та після використання.

Чашки Петрі витримувалися протягом 7 днів при температурі 25°C ±2°C без доступу прямих сонячних променів. Для запобігання повторного засійовання поверхні спорами грибів, зразки зберігалися кришками вгору.

Протягом інкубації і після неї підраховували кількість колоній кожного класу мікроорганізмів і з них розраховували кількість життєздатних бактерій і грибків, присутніх в даному об'ємі вихідного зразка палива. Вимірювання бактеріологічного забруднення проводилося після інкубаційного періоду 48 годин, мікологічного - після 7 днів [1].

Для підрахунку кількості колоній утворюючих елементів (КУЕ) чашку Петрі поміщали на світлий фон та підраховували загальну кількість усіх видимих колоній, відмічаючи їх знизу чашки маркером. Після того, як колонія була підрахована, вона не враховується потворно, навіть якщо збільшилася у розмірах.

Для розрахунку кількості колоній клітин мікроорганізмів в 1 л вихідної суспензії підсумовували результати паралельних висівів і визначали середню кількість колоній за формулою [9]:

$$M = \frac{a * 1000}{V}$$

де а – середня кількість колоній при посіві,

V – обсяг суспензії, взятої для посіву, мл.

Для підвищення точності виконувалися паралельні посіви на чашки Петрі.

## 6 ІДЕНТИФІКАЦІЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО ЗАБРУДНЕННЯ

Бактеріальні ізоляти охарактеризовані морфологічно. Оцінка морфолого-культуральних характеристик мікроорганізмів проводилася на щільному середовищі. Готували препарати-мазки, шпателем відбирали невелику частину бактеріального матеріалу від найбільшої колонії, розмазували рівномірну по склу, фіксували в полум'ї спиртового пальника та досліджували за допомогою мікроскопу «Біолам» С-11 з імерсією за загально прийнятими методиками [10].



Чашки з посівами спочатку оглядали неозброєним оком або через лупу, а потім поміщали їх догори дном та оглядали за допомогою мікроскопу при невеликому збільшенні та звуженій діафрагмі.

Опис колоній проводився за допомогою шкали кольорів з відзначенням пігментації колоній та навколишнього агару, а також морфологічних особливостей (форма та розмір) [11].

Гриби були охарактеризовані і ідентифіковані на основі морфології їх колоній та мікроскопічних особливостей. Для характеристики та ідентифікації плісневих грибів та дріжджів були використані методики посівного культивування та мікроскопічного дослідження з описом розміру, форми, структури колоній та їх кольору.

Рельєф колоній та їх контури визначали за допомогою лупи. Колонії, які відрізнялися хоча б однією ознакою розглядали як різні типи. Для підтвердження особи кожного гриба був використаний мікологічний атлас [12].

Після 48 годин інкубації при 25°C відзначався ріст грибів з утворенням колоній діаметром 1-5 мм. Кожен вид мікроорганізму має певний тип колонії, тому по кількості типів колоній судили про різноманітність мікробіологічного ураження досліджуваних зразків палива.

## 7 ВПЛИВ БІОЦИДНОЇ ПРИСАДКИ НА СТУПЕНЬ БІОЛОГІЧНОГО ЗАБРУДНЕННЯ

Вивчення ефективності запропонованої біоцидної присадки до палива проводили методом культивування на щільних живильних середовищах.

Фільтрувальний папір нарізали на однакові смужки та стерилізували.

Ступінь мікробіологічного забруднення був встановлений для зразків МЕЖКз соняшнику і ріпаку, а також мінерального дизельного палива. Для кожного виду палива були приготовлені суміші з різною концентрацією присадки: 1%, 3%, 5%, 7%, 10%.

Крапля попередньо перемішаного палива стерильним шпателем поміщалася на поверхню паперової смужки і рівномірно розподілялася по її поверхні. Чашки Петрі із нанесеними на смужки зразками витримувалися протягом 7 днів при температурі  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  без доступу прямих сонячних променів.

Проводилося три повторення випробування для підтвердження відтворюваності.

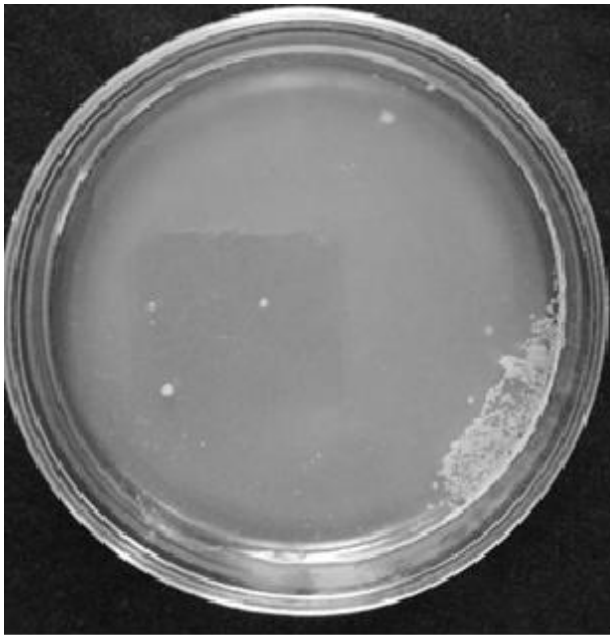
Протягом інкубації та після неї оцінювали швидкість росту колоній та ступінь ураження мікроорганізмами. Висновки щодо ступеня мікробіологічного зараження та ефективності присадки робили через 7 днів інкубації.

Стійкість до мікробіологічного ураження палив з біоцидною присадкою визначали також за наступними критеріями: прозорість та наявність осаду після довготривалого зберігання упродовж трьох місяців.

## 8 РЕЗУЛЬТАТИ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### 8.1 РЕЗУЛЬТАТИ ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО ЗАБРУДНЕННЯ

Фотознімки посівів 0,20 мл кожного виду палива, які відображають ступінь мікробіологічного ураження в різні моменти часу наведені на рис. 1-3.



1 доба



2 доби

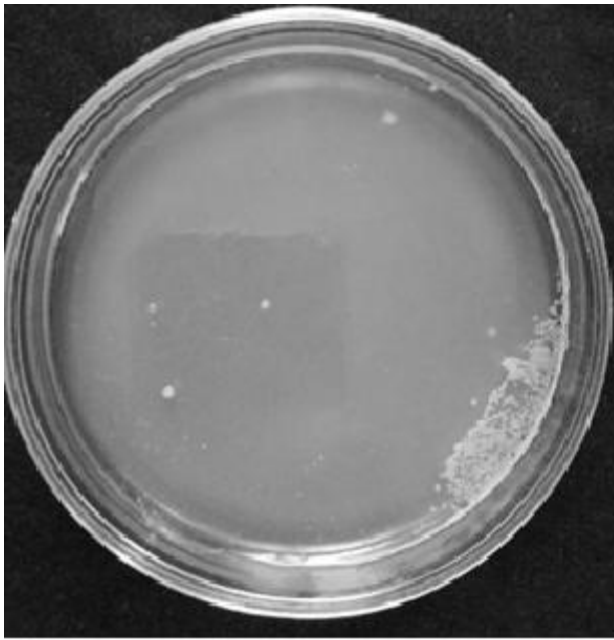


4 доби



7 діб

Рисунок 1 - Ступінь мікробіологічного забруднення дизельного палива



1 доба



2 доби

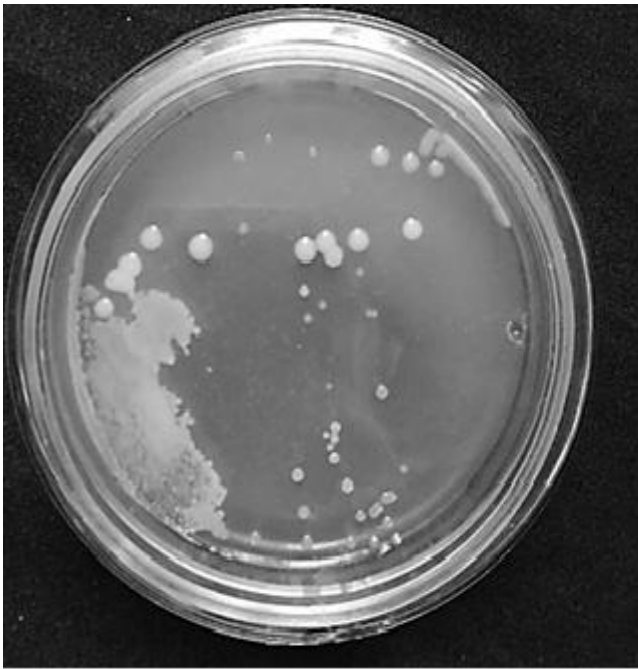


4 доби



7 дiб

Рисунок 2 - Ступiнь мiкробiологiчного забруднення МЕЖК з соняшникової олiї



1 доба



2 доби



4 доби



7 діб

Рисунок 3 - Ступінь мікробіологічного забруднення МЕЖК з ріпакової олії

Результати розрахунків мікробіологічного забруднення різних видів палива наведені в табл. 1 [13].

Таблиця 1. Мікробіологічне забруднення різних видів палива

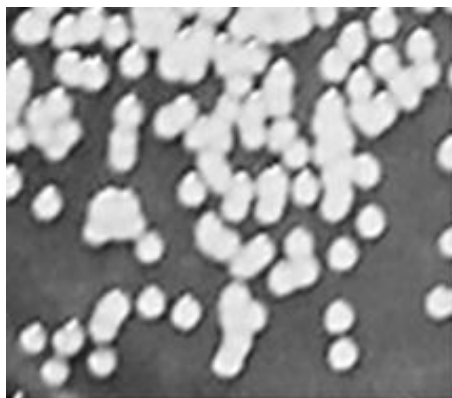
Зразок	Об'єм проби, мл	Бактерії		Гриби	
		Кількість колоній	Забруднення к/л,	Кількість колоній	Забруднення к/л,
Дизельне паливо	0,15	42	280000	1	6667
	0,20	130	650000	1	5000
	0,24	150	625000	1	4167
Середнє значення		-	518333	-	5278
МЕЖК з соняшникової олії	0,15	17	113333	0	0
	0,20	33	165000	0	0
	0,24	58	241667	1	4167
Середнє значення		-	173333	-	1389
МЕЖК з ріпакової олії	0,15	34	226667	3	20000
	0,20	50	250000	4	20000
	0,24	76	316667	6	25000
Середнє значення		-	264444	-	21667

Аналізуючи отримані результати, можна сказати, що зразки дизельного палива і МЕЖК з соняшникової олії мають середнє забруднення спорами грибів, а зразок МЕЖК з ріпакової олії - сильне забруднення, при цьому всі зразки палива мають сильне забруднення бактеріями.

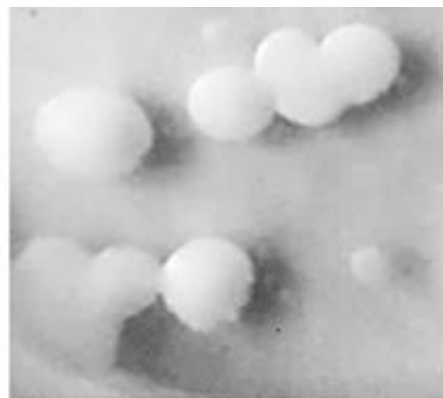
## 8.2 РЕЗУЛЬТАТИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО ЗАБРУДНЕННЯ

Фотознімки зовнішнього виду ізолятів всіх видів бактерій, наявних в різних видах палива, наведені на рисунку 4, опис їх морфології наведений в таблиці 2.

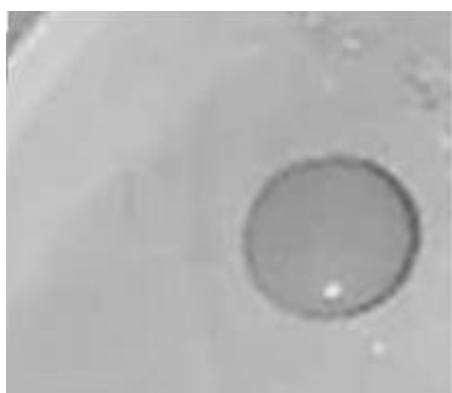
Фотознімки зовнішнього виду ізолятів всіх видів грибів, наявних в різних видах палива, наведені на рисунку 5, опис їх морфології наведений в таблиці 3.



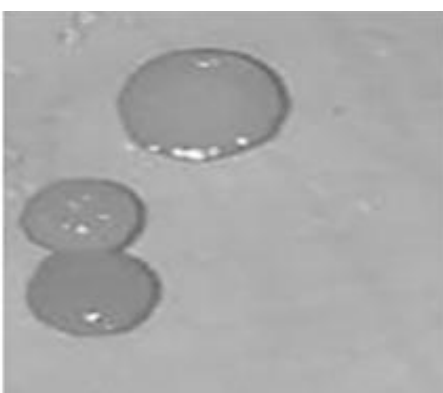
Зразок №1



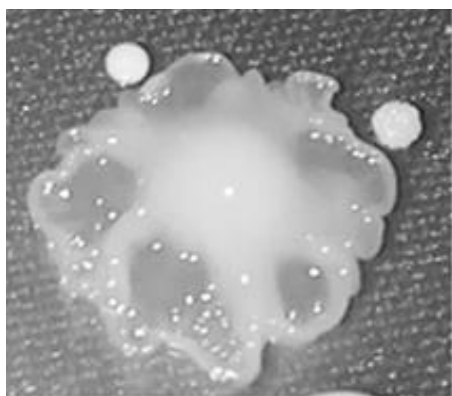
Зразок №2



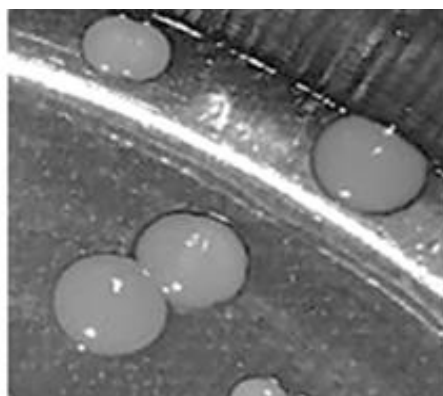
Зразок №3



Зразок №4



Зразок №5



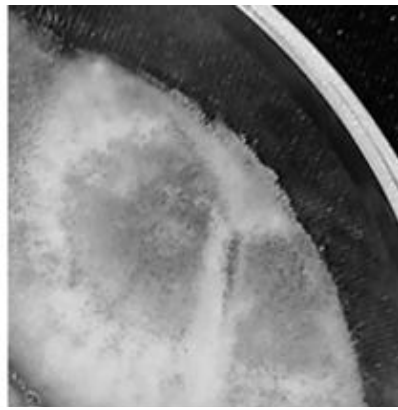
Зразок №6

Зразок №1 – бактерії, присутні в дизельному паливі, зразки №№2-4 – види бактерій, присутні в МЕЖК з соняшникової олії, зразки №№5-6 – види бактерій, присутні в МЕЖК з ріпакової олії

Рисунок 4 – Зовнішній вигляд бактеріальних ізолятів палива



Зразок №1



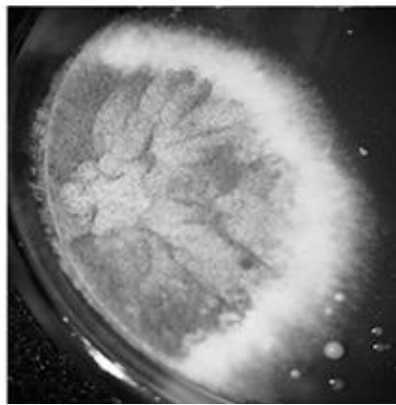
Зразок №2



Зразок №3



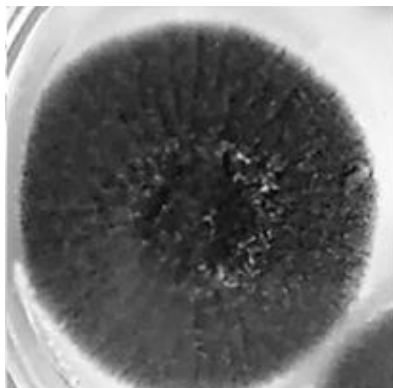
Зразок №4



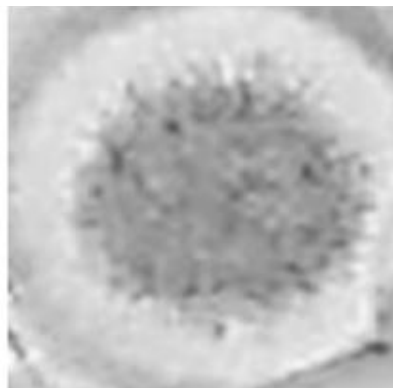
Зразок №5



Зразок №6



Зразок №7



Зразок №8



Зразок №9

Зразки №№1-3 – види грибів, присутні в дизельному паливі, зразки №№4-5 – види грибів, присутні в МЕЖК з соняшникової олії, зразки №№6-9 – види грибів, присутні в МЕЖК з ріпакової олії

Рисунок 5 – Зовнішній вигляд грибкових ізолятів палива



Відзначалося різноманітне фарбування колоній - ряд забарвлень був виразно видоспецифічним (таблиця 3). Колонії починали набувати забарвлення на 3-4 день експерименту, а остаточне інтенсивне забарвлення набували через 7 діб.

Деякі представники цвілевих грибів зустрічалися одноразово в досліджуваних паливах, інші, навпаки, були виділені одразу з двох зразків.

Таблиця 2 – Опис морфології бактеріальних ізолятів

№	Форма колонії	Розмір колонії	Рельєф колонії	Колір	Рід та представник
1	Округла	Дрібні (1-2мм)	Плоский	Прозорі, каламутні	Alcaligenaceae
2	Складної форми	Крупні	Бугристий з випуклим центром	Лимонні	Pseudomonas Putida
3	Округла	Дрібні	З випуклим центром	Лимонні	Micrococcus luteus
4	Округла	Дрібні	Бугристий	Світло-рожеві	Pseudomonas chlororaphis
5	Округла	Крупні ( 4-6 мм)	Куполоподібний	Кремові	Klebsiella aerogenes
6	Округла	Середні (2-4 мм)	Випуклі	Червоно-рожеві	Serratia marcescens

Таблиця 3 – Опис морфології грибних ізолятів

№	Рельєф колонії	Колір	Контури краю	Рід та представник
1	Складно визначити	Напівпрозорий, темно-сірого кольору	Хвилястий	Rhizopus sp
2, 5	З впуклим центром, хвиляста	Світло жовтий з коричневими плямами та білим напленням, білий контур	Хвилястий	Aspergillus baeticus
3, 7	З вираженим центром з хвилями від центру	Чорний с напівпрозорим білий контуром	Рівний	Aspergillus niger
4, 9	Сітчата, бугриста	Білий	Нерівний	Aspergillus candidus
6	З вираженим центром	Темно-зелений зі світлим контуром	Хвилястий	Cladosporium cladosporoides
8	Шорстка	Сіро-блакитний з білим контуром	Рівний	Penicillium commune

З рисунків видно, що всі зразки заражені бактеріями роду *Pseudomonas*, що не роблять істотного впливу на експлуатаційні характеристики палива. У дизельному паливі присутній гриб *Cladosporium Resinae*, в МЕЖК з ріпакової олії - *Cladosporium Resinae* та *Aspergillus*. Обидва роди грибів здійснюють руйнівний вплив на паливо і конструкційні матеріали двигуна і паливної системи, крім того, гриби роду *Aspergillus* є патогенними.

## 10 РЕЗУЛЬТАТИ ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ДОДАВАННЯ БІОЦИДНОЇ ПРИСАДКИ

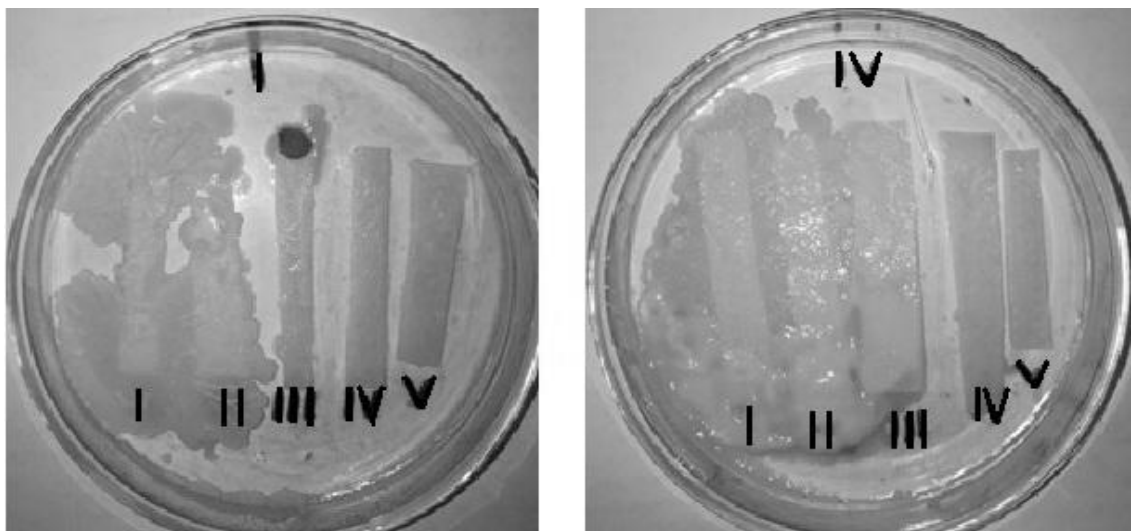
На рис. 6 показані зразки палива після довготривалого зберігання з додаванням біоцидної присадки та без неї.

Ступінь мікробіологічного забруднення різних палив з додаванням різної кількості біоцидної присадки наведена на рисунках 7-9.



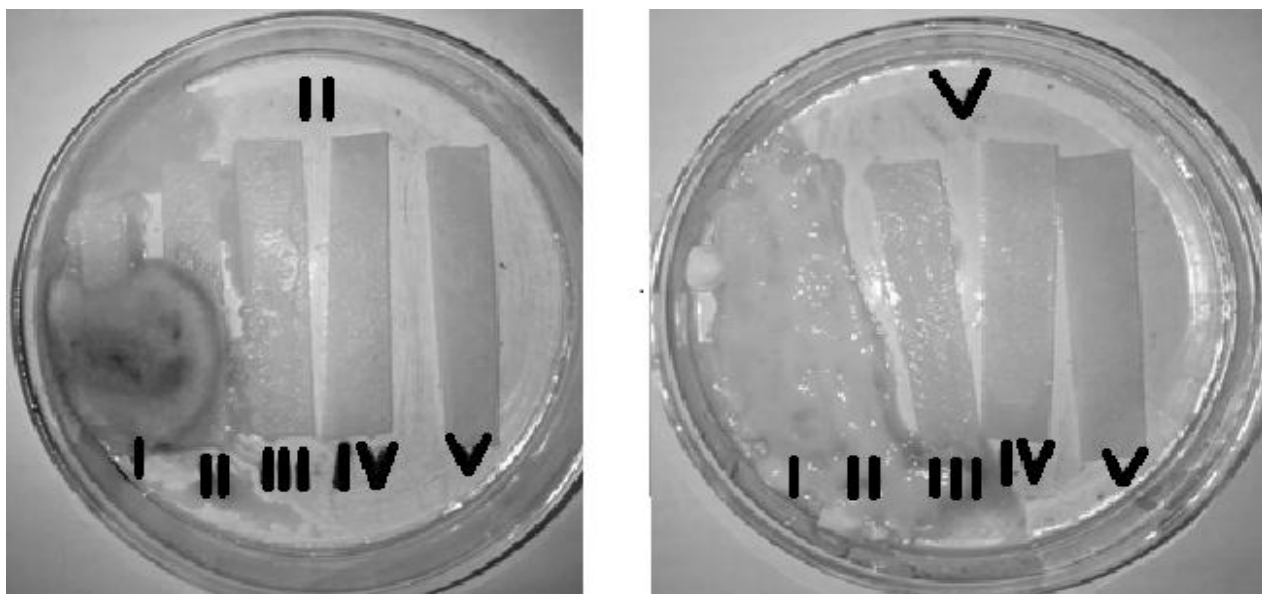
Оцінка біоцидної дії присадки наведена в табл. 4.

Рисунок 6 – МЕЖК з додаванням біоцидної присадки (праворуч) та без неї (ліворуч)



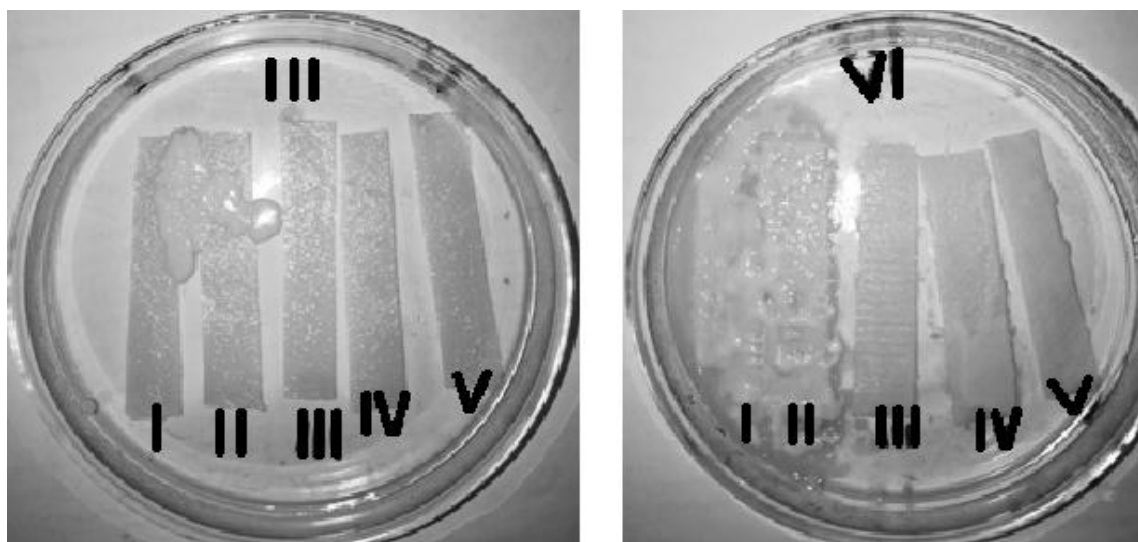
Смужки №№ I, II, III, IV та V – паливо з додаванням 1, 3, 5, 7 та 10% об. присадки відповідно.

Рисунок 7 - Ступінь мікробіологічного забруднення МЕЖК з соняшникової олії з біоцидною присадкою.



Смужки №№ I, II, III, IV та V – паливо з додаванням 1, 3, 5, 7 та 10% об. присадки відповідно.

Рисунок 8 - Ступінь мікробіологічного забруднення МЕЖК з ріпакової олії з біоцидною присадкою.



Смужки №№ I, II, III, IV та V – паливо з додаванням 1, 3, 5, 7 та 10% об. присадки відповідно.

Рисунок 9 - Ступінь мікробіологічного забруднення дизельного палива з біоцидною присадкою.

Таблиця 4. Обробка результатів випробування присадки

Композиція	Концентрація биоциду, %	Мікробіологічне ураження
МЕЖК з соняшникової олії	-	+
МЕЖК з ріпакової олії	-	+
Дизельне паливо	-	+
МЕЖК з соняшникової олії + біоцидна присадка	1	+
	3	+
	5	Частковий ріст
	7	-
	10	-
МЕЖК з ріпакової олії + біоцидна присадка	1	+
	3	+
	5	Частковий ріст
	7	-
	10	-
Дизельне паливо + біоцидна присадка	1	+
	3	+
	5	-
	7	-
	10	-

Як видно з рис. 7-9 та табл. 4 в більшості випадків присадка повністю придушувала зростання мікроміцетів грибів та бактерій при мінімальній концентрації 5 % мас. Було встановлено, що використання даної присадки не впливає на фізико-хімічні та експлуатаційні показники палива та дозволяє забезпечити високу біоцидну ефективність.

## ВИСНОВКИ

1. Розроблено удосконалену методику виявлення наявності мікробіологічного ураження палива та кількісного визначення його ступеня.
2. Проведене визначення ступеня мікробіологічного ураження різних моторних палив.
3. Виділенні, охарактеризовані та ідентифіковані мікроорганізми, які знаходилися в паливі. Серед них виділені активні деструктори палив та конструкційних матеріалів .
4. Виявлено, що досліджені зразки палива були забруднені грибами та великою кількістю бактерій, які можуть спричинити проблеми при використанні палива. Рекомендується ретельний контроль та технічне обслуговування паливних систем.
5. Запропоновано недорогу та ефективну присадку, яка не має негативного впливу на експлуатаційні характеристики палив.
6. Перевірена ефективність біоцидної присадки. Знайдені мінімальні ефективні концентрації біоцидної присадки для застосування в дизельних паливах з альтернативними компонентами.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Кривушина, А. А. Микромицеты в авиационном топливе [Текст] : автореф. дис. канд. биолог. наук : 03.02.12 / Кривушина Анастасия Александровна ; Московский гос. ун-т имени М.В. Ломоносова. - Москва, 2012. - 24 с.
2. Матвеева, Е. Л. Микробиологическое поражение авиационных топлив [Текст] / Е.Л. Матвеева, О.А. Васильченко, Д.А. Демянко // Системи озброєння і військова техніка. – 2011. - № 2. - С. 152-156.
3. Семенов, С. А. Характеристика процессов и особенности повреждения материалов техники микроорганизмами в условиях эксплуатации [Текст] / С.А. Семенов, К.З. Гумаргалиева, Г.Е. Заиков // Вестник МИТХТ.– 2008. - № 2. - С. 23.
4. Onuorah, S. Microbial Contaminants in the Commercial Aviation Fuel Obtained from Benin City Airport, Nigeria [Text] / S. Onuorah, I. Obika, M. Orj, F. Odibo // Universal Journal of Microbiology Research. – 2015. – № 3. – P. 31 – 35.
5. Shkilniuk, I. . Investigation of the microbiological stability of traditional and alternative aviation fuels [Text] /I. Shkilniuk // 1st International Symposium on Sustainable Aviation: abstract book of International Simposium (Istanbul, Turkey, 2015). – Istanbul (Turkey), 2015. - P.4.
6. Васильева, А. А. Влияние температуры на рост и жизнеспособность *Normoconis resinse* и *Phalophora sp.*, развивающихся в авиационном топливе [Текст] / А.А. Васильева, Л.Н. Чекунова, А.В. Полякова // Микология и фитопатология. – 2009. – т. 43, вып. 4. - С. 152-156.
7. Поляк, М. С. Питательные среды для медицинской микробиологии [Текст] / М. С. Поляк, В.И. Сухаревич, М. Э. Сухаревич. - СПб.: Научно-исследовательский центр фармакотерапии , 2002. - 80 с.
8. ДСТУ 7357:2013 Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического контролирования [Текст] - На заміну ГОСТ 9225-84 ;

надано чинності 2014-01-01. - К. : МІНЕКОНОМПРОЗВИТКУ УКРАЇНИ, 2014. - 38 с.

9. Debarati, D. Essential practical handbook of cell biology & genetics, biometrya [Text] / D. Debarati. - Kolkata : Academic Publishers, 2017. - 176 P.

10. Световая микроскопия микроорганизмов. Практическое руководство. — М.: Издательство «Агровет», 2013. — 288 с.: ил.

11. Levanova, L. A. Systematics, taxonomy and classification of bacteria [Text] / L. A. Levanova, Y. V. Zakharova // Fundamental and clinical medicine. - 2017. - Vol. 2, № 1. - P. 91 – 101.

12. Воробьев, А.А. Атлас-руководство по бактериологии, микологии, протозоологии и вирусологии с иммунологией и аллергологией [Текст] / А.А. Воробьев [и др.]. - Москва : Первый МГМУ им. Сеченова, 2008. - 272 с.

13. Дарина Попитайленко, Олена Шевченко, Валерія Каменєва Мікробіологічне забруднення біодизельних палив // Матеріали X Міжнарод.аук.-тех.конф. «Поступ в нафтогазопереробній та нафтохімічній промисловості». Львів, 18–23 травня 2020 р с. 42-44